

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
**SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Curriculum di immunologia  
XXV ciclo  
Anno accademico 2011/2012

*DOTTORANDA: DOTT.SSA **CATERINA LONATI***

# **MODIFICAZIONI FENOTIPICHE DELL'ARTERIA BASILARE E RIPERCUSSIONI PERIFERICHE DURANTE EMORRAGIA SUBARACNOIDEA. POTENZIALE TERAPEUTICO DELLE MELANOCORTINE**

*TUTORE: PROF. **SILVANO BOSARI***

*CORRELATORE: DR. **STEFANO GATTI***

***TESI SVOLTA PRESSO IL CENTRO RICERCHE CHIRURGICHE PRECLINICHE,  
FONDAZIONE IRCCS CÀ GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO***

***BORSA DI DOTTORATO: U.O. CENTRO TRAPIANTI DI FEGATO, FONDAZIONE  
IRCCS CÀ GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO***

## **RIASSUNTO**

**Background:** L'emorragia subaracnoidea (ESA) è una condizione patologica caratterizzata da un accumulo di sangue nello spazio subaracnoideo conseguente a trauma cranico o rottura di un aneurisma. Il decorso clinico è gravato da complicanze cerebrovascolari e sistemiche che peggiorano significativamente la prognosi del paziente. La complicanza più comune e grave dell'ESA è il vasospasmo dell'arteria basilare, che può causare ischemia cerebrale. L'intensa reazione infiammatoria che si sviluppa nello spazio subaracnoideo costituisce un importante fattore patogenetico del vasospasmo. Le complicanze periferiche infettive e infiammatorie, assai frequenti in pazienti con ESA, sembrano essere anche una conseguenza diretta del danno cerebrale. Infatti, il rilascio di citochine nel SNC attiva in modo incontrollato l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, il sistema nervoso simpatico e la via anti-infiammatoria colinergica. Ciò causa l'induzione di uno stato di immunodepressione che aumenta la suscettibilità dell'organismo alle infezioni. Contemporaneamente, nei tessuti periferici, si verifica l'attivazione della risposta flogistica e dell'infiltrazione leucocitaria. Ad oggi, non esiste ancora una strategia risolutiva per il trattamento dell'ESA. Le melanocortine potrebbero costituire un'opportunità terapeutica innovativa. Tali peptidi, derivati dal precursore pro-opiomelanocortina, sono rappresentati principalmente dall'ormone  $\alpha$ -melanocitostimolante ( $\alpha$ -MSH) e dall'adrenocorticotropina (ACTH). Essi esercitano potente attività anti-infiammatoria, anti-piretica e immunomodulante. Gli effetti delle melanocortine si esplicano attraverso la modulazione dell'espressione di mediatori pro-infiammatori e l'attivazione di circuiti neurali immunomodulanti endogeni.

**Obiettivi Della Ricerca:** L'obiettivo generale è proporre un nuovo approccio terapeutico per il trattamento dell'ESA. Gli scopi specifici erano: A) Identificare e caratterizzare le modificazioni molecolari indotte a livello dell'arteria basilare e negli organi periferici (milza, fegato e intestino) durante ESA sperimentale; B) Valutare l'efficacia della terapia con una melanocortina sintetica nel prevenire o attenuare le alterazioni associate all'ESA.

Lo studio è articolato in 3 fasi: 1) Sviluppo del modello di ESA nel ratto; 2) Analisi molecolare delle ripercussioni precoci e tardive nell'arteria basilare e in periferia; 3) Valutazione dell'efficacia terapeutica delle melanocortine.

## **Risultati:**

Ottimizzazione e standardizzazione della procedura basata su singola iniezione di sangue autologo in cisterna magna per indurre l'ESA nel ratto.

L'analisi di gene profiling indica che l'ESA induce già a 4 ore una profonda alterazione del profilo di espressione dell'arteria basilare. La valutazione del calibro dell'arteria a 5 giorni mostra una riduzione del diametro vascolare del 50%. I risultati preliminari in organi periferici forniscono indicazioni circa la capacità dell'ESA di attivare una risposta extracerebrale e incoraggiano il proseguimento della ricerca allo scopo di caratterizzare in maniera più approfondita tale fenomeno. Il trattamento sistemico con la melanocortina sintetica NDP-MSH ha prevenuto molte delle alterazioni indotte dall'ESA nell'arteria basilare. L'effetto protettivo sembra essere esercitato attraverso la modulazione di diverse vie di segnalazione. NDP-MSH ha ridotto significativamente la vasocostrizione dell'arteria basilare a 5 giorni post-ESA.

## **ABSTRACT**

### **Background:**

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a pathological condition caused by bleeding into the subarachnoid space. Central and peripheral complications worsen patient outcome. Vasospasm is a severe central complication of SAH. It can cause ischemia and permanent brain damage or death. Bleeding-induced inflammation in the subarachnoid space contributes to vasospasm pathogenesis. In addition, peripheral organs develop inflammatory and infectious complications that seem to be a direct consequence of central injury. Indeed, cytokine production induced by brain damage causes activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, sympathetic nerve signalling and cholinergic anti-inflammatory pathway. These signals induce immunodepression that could partly account for SAH-related increased susceptibility to infection. In peripheral tissues, activation of  $\alpha 2$ -adrenoreceptors triggers local inflammatory response and leukocyte recruitment. No consistently efficacious therapies have been identified and implemented in clinical practice for this dire condition. Treatment with melanocortins could constitute an innovative therapeutic strategy. Melanocortin peptides, such as  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH), are pro-opiomelanocortin derivatives that exert potent anti-inflammatory, immunomodulatory, and antipyretic action. These molecules can directly modulate expression of pro-inflammatory molecules in responsive cells and activate endogenous anti-inflammatory neural circuits.

### **Objectives:**

The general aim in the present research is to implement a novel therapeutic approach for SAH treatment. Specific goals were: A) To identify and characterize SAH-induced molecular alterations in the basilar artery and in the spleen, large intestine and liver; B) To evaluate whether melanocortin treatment can attenuate SAH-associated central and peripheral complications.

The present research is divided in 3 phases: 1) Development of an experimental model to induce SAH in the rat; 2) Analysis of SAH-associated molecular alterations in the basilar artery and in peripheral organs at 4 hours and 5 days post-hemorrhage; 3) Evaluation of the potential protective action of melanocortin treatment.

### **Results:**

Optimization and standardization of surgical procedure based on single autologous blood injection into the cisterna magna to induce SAH in the rat.

Gene profiling analysis indicates that SAH induced a profound gene expression alteration in the basilar artery at 4 h. Morphometric analysis shows a marked vasoconstriction in the basilar arteries from the SAH group relative to controls.

Preliminary data indicate that hemorrhage exerts detrimental effects in the spleen and liver. Further investigations are required to better analyze peripheral consequences of central injury.

Systemic administration of the synthetic melanocortin NDP-MSH prevented most of SAH-induced alterations in the basilar artery. Protective effect is exerted through modulation of different signaling pathways. In addition, NDP-MSH significantly attenuated basilar artery vasoconstriction at 5 days post-SAH.

## SOMMARIO

Lista dei Simboli.....	7
1. Introduzione .....	8
1.1. L'emorragia Subaracnoidea .....	8
1.1.1. Complicanze dell'ESA .....	10
1.2. Le Melanocortine .....	25
1.2.1. I peptidi Melanocortinici e i recettori MCR .....	26
1.2.2. Proprietà anti-infiammatorie delle melanocortine .....	28
1.2.3. Circuiti anti-infiammatori endogeni basati sulle melanocortine .....	32
2. Scopo del lavoro .....	36
3. Piano Sperimentale .....	37
4. Materiali e Metodi .....	38
4.1. Procedura chirurgica.....	38
4.2. Protocolli sperimentali, trattamenti e campionamento.....	40
4.3. Estrazione di RNA e retrotrascrizione a cDNA .....	41
4.4. Real-time PCR.....	43
4.5. Studio dell'espressione genica mediante Taqman Low-density arrays (TLDA) .....	45
4.6. Western Blot .....	46
4.7. Misurazioni morfometriche delle arterie basilari .....	47
4.8. Dosaggio TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nel plasma .....	48
4.9. Dosaggio NO plasmatico .....	48
4.10. Analisi statistica .....	49
5. Risultati .....	50
5.1. Ottimizzazione della procedura chirurgica per l'induzione dell'ESA nel ratto .....	50
5.2. Effetti sul fenotipo molecolare dell'arteria basilare dell'ESA e valutazione dell'efficacia del trattamento con melanocortine .....	57
5.2.1. Il trattamento con NDP-MSH inibisce le modificazioni indotte precocemente dall'ESA nell'arteria basilare .....	57
5.2.2. Il trattamento con NDP-MSH riduce il vasospasmo dell'arteria basilare .....	64
5.3. Studio preliminare degli effetti sistemici e negli organi periferici dell'ESA ..	66
5.3.1. L'ESA non è associata ad un incremento di citochine pro-infiammatorie e NO nel plasma .....	66

5.3.2. L'ESA non induce modificazioni significative dell'espressione genica nel tratto intestinale .....	67
5.3.3. Il danno centrale e il versamento ematico inducono alterazioni precoci nella milza .....	68
5.3.4. Il danno centrale è associato ad alterazioni precoci e tardive dell'espressione genica epatica .....	71
6. Discussione .....	75
7. Conclusione e Prospettive Future .....	79
8. Bibliografia .....	80

## LISTA DEI SIMBOLI

$\alpha$ -MSH:  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone; ormone  $\alpha$ -melanocitostimolante  
ACTH: adrenocorticotrophic hormone; adrenocorticotropina  
cAMP: cyclic AMP, AMP ciclico  
CIDS: CNS-injury-induced immunodepression; immunodepressione indotta dal danno centrale  
CRH: corticotropin releasing hormone  
CT: threshold Cycle  
CXCL-1: chemokin (C-X-C motif) ligand 1  
CXCL-2: chemokin (C-X-C motif) ligand 2  
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase-1 e 2  
ESA: emorragia subaracnoidea  
ET-1: endotelina-1  
HMOX1: heme oxygenase 1  
ICAM-1: inter-Cellular Adhesion Molecule 1  
IL-1 $\beta$ : interleuchina 1 beta  
IL-6: interleuchina 6  
I $\kappa$ B $\alpha$ : I-kappa-B-alpha  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MCR: melanocortin receptor, recettore melanocortinico  
MMP: Metalloproteasi  
NDP-MSH: [Nle4-dPhe7]-MSH  
NF- $\kappa$ B: nuclear-factor- $\kappa$ -B  
NO: ossido nitrico  
NOS2: ossido Nitrico Sintetasi inducibile  
PC: pro-proteina convertasi  
PKA: protein kinase A  
POMC: pro-opiomelanocortina  
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
SAH: subarachnoid hemorrhage  
SIRS: system inflammatory response syndrome; sindrome da risposta infiammatoria sistemica  
SNC: sistema nervoso centrale  
SNS: sistema nervoso simpatico  
TGF- $\beta$ : trasformig growth factor- $\beta$   
TNF- $\alpha$ : tumor Necrosis Factor alpha

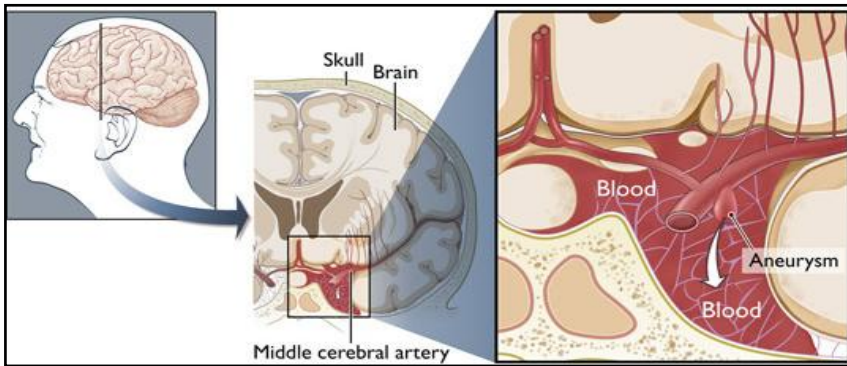
## **1.INTRODUZIONE**

### **1.1.L'EMORRAGIA SUBARACNOIDEA**

L'emorragia subaracnoidea (ESA) è una condizione patologica causata dall'accumulo di sangue nello spazio subaracnoideo (Figura 1). Ha un'incidenza media tra 10 e 11 casi per 100.000 abitanti. La causa più comune di ESA è il trauma cranico, con un'incidenza di circa il 30% per i traumi cranici gravi. L'ESA spontanea è causata nel 75% dei casi dalla rottura di un aneurisma intracranico. Altre condizioni meno comuni che possono determinare insorgenza di ESA sono malformazioni vascolari, vasculiti, tumori cerebrali o assunzione di tossine (cocaina, anfetamine).

L'ESA è associata ad un'elevata mortalità; circa il 12% dei pazienti muore prima di poter ricevere assistenza medica. Studi epidemiologici stimano che il 40% dei pazienti che giungono in ospedale muoiono per le conseguenze dell'ESA, mentre la morbidità neurologica stimata ad 1 anno risulta il 20%. In aggiunta, solo il 44% dei pazienti sopravvissuti riesce a ritornare al proprio impiego lavorativo pre-ESA: studi recenti dimostrano che l'impatto sulle attività quotidiane è devastante e la qualità di vita risulta ridotta nel 92% circa dei casi [1]. Il costo sociale di questa malattia rimane quindi, molto, elevato.





*Figura 1 L'emorragia subaracnoidea*

### **1.1.1.COMPLICANZE DELL'ESA**

Le conseguenze patofisiologiche dell'ESA dipendono principalmente dal volume e dalla localizzazione del sanguinamento, dall'età del paziente e dalle premorbidità presenti. L'accumulo ematico a livello degli spazi subaracnoidei determina una serie di fenomeni a cascata responsabili delle conseguenze a breve, medio e lungo termine, che condizionano in maniera significativa la prognosi dei pazienti. Possiamo suddividere le complicanze associate ad ESA in cerebrovascolari e periferiche.

#### **1.1.1.1. Complicanze Cerebrovascolari: il Vasospasmo**

La complicanza più grave e comune dell'ESA è il vasospasmo dei vasi della base cranica [2]. Tale fenomeno consiste in una riduzione diffusa o focale del diametro del lume vascolare, principalmente dell'arteria basilare, che può provocare una diminuzione del flusso ematico regionale o globale e potenzialmente ischemia e/o infarto. Il rischio di vasospasmo aumenta tra il terzo ed il settimo giorno post-ESA e si stima che esso sia responsabile di mortalità o morbidità nel 10-15% dei casi dei pazienti. Il vasospasmo può essere causa determinante dell'Ischemia Cerebrale Tardiva. Infatti, circa metà dei pazienti con ESA da aneurisma intracranico sviluppano un disturbo ischemico focale o un deterioramento cognitivo dovuto a vasospasmo cerebrale. Molti di questi vanno incontro a decesso o a gravi disabilità neurologiche [3].

#### **Meccanismi Molecolari alla base del Vasospasmo**

Molte ricerche cliniche e pre-cliniche sono state condotte allo scopo di identificare e caratterizzare i diversi fattori che causano il vasospasmo. Sebbene non vi sia tuttora una spiegazione univoca, è apparso chiaro che la concomitanza di diversi fenomeni contribuiscono allo sviluppo del vasospasmo. Fra questi vi sono: l'attivazione di una risposta infiammatoria nello spazio subaracnoideo, lo stress ossidativo, il rimodellamento vascolare, la produzione di endotelina-1 (ET-1) e la deplezione di ossido nitrico (NO) (Figura 2).

La *risposta infiammatoria* che si sviluppa nello spazio subaracnoideo dopo ESA sembra essere la causa principale della genesi del vasospasmo. Diverse evidenze cliniche suggeriscono, infatti, un legame tra infiammazione e vasocostrizione: marker di flogosi quali febbre, leucocitosi e presenza di immunocomplessi circolanti sono comunemente presenti nei pazienti che sviluppano vasospasmo [4]. Inoltre, la valutazione istopatologica di arterie cerebrali spastiche evidenzia la presenza di leucociti mononucleati al di sotto dell'endotelio delle arterie. In modelli sperimentali, a livello dell'arteria basilare si riscontra la produzione di molecole pro-infiammatorie e molecole di adesione [5]. In aggiunta, diversi studi riportano come l'iniezione di agenti infiammatori in assenza di componenti del sangue (eritrociti, emoglobina) nello spazio subaracnoideo sia sufficiente ad indurre il fenomeno del vasospasmo [6]. Sulla base di tali evidenze cliniche e precliniche, l'espressione di molecole di adesione, di mediatori dell'infiammazione e di regolatori della dilatazione/permeabilità dei vasi, è stata estesamente indagata nell'arteria basilare dopo ESA.

E' apparso subito chiaro come l'up-regolazione dei trascritti per selectine, integrine e altre molecole di adesione costituisca un passaggio chiave nello sviluppo della risposta infiammatoria nello spazio subaracnoideo. Infatti, l'espressione di tali molecole a livello delle cellule endoteliali promuove il reclutamento dei leucociti. Studi prospettici hanno dimostrato che negli individui colpiti da ESA il livello di E-selectine risulta maggiore rispetto al campione controllo e che i livelli più alti si riscontrano nei soggetti che sviluppano vasospasmo di grado moderato o severo [7]. Studi in un modello di vasospasmo dell'arteria femorale di ratto, riportano che la somministrazione di anticorpi monoclonali anti-LFA-1 e anti-Mac-1 è in grado di ridurre l'entità dello spasmo e l'infiltrato di granulociti/macrofagi [8]. Anche l'up-regolazione della molecola d'adesione Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) sembra avere un ruolo chiave per l'inizio della risposta infiammatoria. Diversi studi riportano che l'incremento dei livelli di questa molecola compare già 3 ore dopo la

formazione del coagulo e persiste per circa 24 ore [9]. Infine, studi clinici hanno confermato come l'ESA sia associata ad un'aumentata espressione di queste molecole anche nell'uomo [7].

Oltre all'induzione delle molecole d'adesione, numerosi studi preclinici e clinici hanno misurato un'aumento dell'espressione di mediatori dell'infiammazione a livello della parete arteriosa [10]. L'espressione di geni pro-infiammatori come Interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleuchina 6 (IL-6), Chemokin (C-X-C motif) ligand 1 e 2 (CXCL-1 e CXCL-2) e CCL20, risulta essere incrementata dopo ESA, con un picco iniziale del mRNA per queste molecole tra 1 e 6 ore post-emorragia [9-11]. Tale induzione genica è spesso preceduta dall'attivazione di 2 pathways di segnalazione: p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) e Extracellular signal-regulated kinase-1 e 2 (ERK1/2) [11]. Analogamente, in tempi più tardivi sono stati evidenziate variazioni nei livelli di citochine nel liquor e plasma [10]: in particolare, i livelli di IL-6 e platelet activating factor (PAF) incrementano entro i primi 4 giorni dopo ESA e rimangono elevati sino al il quattordicesimo giorno, mentre IL-1 mostra un aumento transiente tra il quinto e il nono giorno [12].

Diversi studi hanno riportato l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare inducibile *Nuclear-factor- $\kappa$ -B* (NF- $\kappa$ B) nelle arterie basilari dopo ESA [14]. E' stato ipotizzato, quindi, che l'attivazione di tale fattore sia la causa dello sviluppo della reazione infiammatoria nello spazio subaracnoideo in seguito al versamento ematico. NF- $\kappa$ B è responsabile della trascrizione di citochine (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ), fattori di crescita (G-CSF, M-CSF, GM-CSF), recettori per citochine, proteine legate allo stress (SAA, fattori del complemento B, C3 e C4), molecole di adesione leucocitarie (ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1, E-selectine), molecole immunoregulatorie (Igk, MHC di classe I e II,  $\alpha$ 2-microglobulina, TAPI), regolatori dell'apoptosi ed enzimi implicati nella regolazione della permeabilità vascolare [15]. L'attivazione di NF- $\kappa$ B a livello cerebrale dopo ESA sembra seguire un'andamento bifasico: ad un picco iniziale (2-6 ore dopo l'evento emorragico) ne segue un secondo dopo 12-48 ore. Numerosi studi preclinici hanno confermato l'ipotesi per cui NF- $\kappa$ B possa avere una posizione chiave nella genesi del vasospasmo [14, 16]. In un modello di ESA nel coniglio, la somministrazione icv di oligo-DNA decoy per NF- $\kappa$ B ha ridotto la vasocostrizione e l'infiammazione a livello dell'arteria basilare [17]. In studi condotti in modelli sperimentali analoghi è stato evidenziato come il trattamento con pirrolidinditiocarbammato (PDTC), un inibitore dell'attività di questo fattore di trascrizione, sia in grado di ridurre sia il vasospasmo che l'espressione di molecole pro-infiammatorie [14].

L'incremento dell'espressione di citochine e chemochine è responsabile del reclutamento e dell'attivazione dei leucociti, l'aumento del mRNA per le metalloproteasi è, invece, correlato con le modificazioni che avvengono a livello delle pareti dei vasi, responsabili dell'alterata permeabilità della barriera emato-encefalica e del processo di vasocostrizione/vasodilatazione. L'aumento dell'espressione di Metalloproteasi 8, 9 e 13 (MMP8, MMP9, e MMP13) è stato evidenziato entro 24 ore in numerosi modelli sperimentali di ESA [10, 11]. L'up-regolazione della MMP9 è responsabile della degradazione della proteina di giunzione Zonula Occludens-1 (ZO-1), molecola chiave nel controllo della permeabilità delle pareti dei vasi [13].

L'*endotelina-1 (ET-1)* è un potente vasocostrittore endogeno prodotto dalle cellule endoteliali, dagli astrociti e dai leucociti in risposta all'ischemia e alla presenza di ossiemoglobina nello spazio subaracnoideo [18, 19]. La massiccia produzione di questa molecola durante ESA potrebbe essere causa diretta del restringimento del lume arterioso. Diverse evidenze sperimentali supportano questa ipotesi. In pazienti con vasospasmo, sono stati identificati elevati livelli di ET-1 nel liquor [19], mentre, in modelli sperimentali, la somministrazione di ET-1 in cisterna magna ha indotto vasocostrizione [20]. Inoltre, in studi preclinici anticorpi monoclonali contro ET-1 o il suo recettore si sono dimostrati in grado di attenuare il vasospasmo [21, 22].

Lo *stress ossidativo* delle cellule muscolari sembra essere un altro fattore causale dello sviluppo del vasospasmo. Infatti, le specie reattive dell'ossigeno prodotte durante stress ossidativo sono causa della proliferazione delle cellule muscolari e i cambiamenti fenotipici della parete vascolare che si osservano frequentemente nel vasospasmo [23]. Anche l'*emoglobina ferrosa* rilasciata dal coagulo è causa di un aumento della contrattilità delle cellule muscolari lisce, in quanto provoca stress ossidativo alle cellule muscolari [24] attraverso l'induzione della produzione di radicali liberi e della perossidazione dei lipidi di membrana, [10]. L'emoglobina è associata anche all'induzione dell'espressione della ET-1 e all'eliminazione di NO [25].

Alcuni autori suggeriscono un ruolo della *deplezione di NO* nella fisiopatologia del restringimento della parete arteriosa. Sono state rilevate, infatti, la scomparsa dell'immunoreattività per la NO sintasi nelle arterie con spasmo, la disfunzione della NO sintasi neuronale nei vasi cerebrali. L'ossido nitrico (NO), un vasodilatatore endogeno, viene prodotto dalla Ossido Nitrico Sintetasi Neuronale (Nos1 o nNos), Endoteliale (Nos3 o eNos) o Inducibile (Nos2 o iNos): mentre i primi 2 enzimi regolano la presenza di NO nei vasi a livello di avventizia e intima, Nos2 è coinvolta nello sviluppo della risposta infiammatoria. Diversi studi hanno dimostrato come i livelli di Nos2 risultino incrementati e l'attività di Nos1 e Nos3 alterata già dopo 24 ore dall'ESA [26]. L'inibizione del rilassamento muscolare può contribuire al restringimento della parete arteriosa. L'up-regolazione di Nos2, invece, potrebbe rivestire un ruolo chiave nello sviluppo del processo infiammatorio post-ESA.

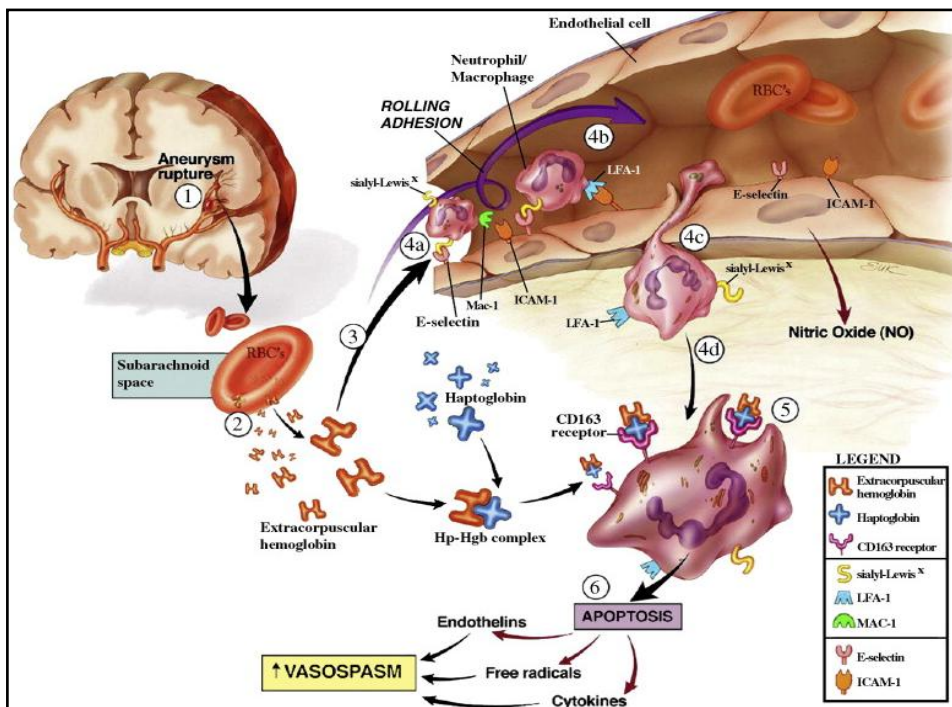


Figura 2 Eventi molecolari alla base dello sviluppo del vasospasmo. La rottura di un aneurisma o un trauma cranico provocano la fuoriuscita di sangue nello spazio subaracnoideo. Il rilascio di emoglobina induce l'espressione di molecole di adesione sulla superficie di cellule endoteliali e leucociti. A livello locale si verifica la produzione di citochine e chemochine con richiamo e attivazione di leucociti. La presenza di queste molecole, insieme alla produzione di ET-1, alla generazione di radicali liberi dell'ossigeno e alla deplezione di NO, predispone allo sviluppo del vasospasmo [5]

### **1.1.1.2. Complicanze periferiche**

Oltre alle complicanze centrali e neurologiche, i pazienti con ESA presentano frequentemente complicazioni sistemiche e periferiche, fra cui febbre, disordini cardiovascolari, respiratori, ematologici ed endocrini che contribuiscono significativamente a peggiorare la prognosi [27]. La febbre, che nel 25% dei casi ha un'eziologia neurologica, si presenta in circa il 40% dei pazienti e comporta un aumento dell'edema cerebrale e della pressione intracranica con un'esacerbazione del danno ischemico [28, 29]. Inoltre, è associata ad un aumento significativo del rischio di vasospasmo e ad un peggioramento dell'outcome a 3 mesi [29].

I pazienti con ESA presentano complicanze infiammatorie con interessamento degli organi periferici associate in alcuni casi alla sindrome da risposta infiammatoria sistemica (system inflammatory response syndrome, SIRS) [29]. La complicanza infiammatoria più comune è la polmonite, che si presenta nel 20% dei pazienti con ESA [30].

#### ***Fenomeni alla base dello sviluppo delle complicanze infiammatorie e infettive***

Il danno al sistema nervoso centrale di per sé sembra contribuire allo sviluppo delle complicanze infiammatorie e infettive. Infatti, tali complicazioni non sono peculiari dell'ESA, ma si presentano frequentemente in pazienti dopo danno cerebrale acuto a origine traumatica o ischemica e lesioni al midollo spinale. La febbre si presenta 61% dei casi di ischemia cerebrale, [31], mentre le infezioni colpiscono il 23-65% dei pazienti e costituiscono la principale causa di morte [32]. Fra queste, la polmonite è la più comune: 22% dei pazienti, contro il 4-9% dei pazienti con altre patologie in cui non vi è un interessamento del sistema nervoso centrale. La gravità della polmonite correla con la severità dell'ischemia, con la localizzazione dell'infarto e con il deficit neurologico. Anche in pazienti con danno cerebrale di origine traumatica la polmonite è molto frequente (21-60% dei casi) [33]. In soggetti con lesioni al midollo spinale, si rivelano infezioni polmonari e del tratto urinario (28-38%) [32].

In considerazione di queste evidenze, sono stati compiuti diversi studi per identificare una causa comune alla base dello sviluppo delle complicazioni infiammatorie associate al danno al SNC. Studi sperimentali hanno indicato che il danno tissutale e l'intensa produzione di IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 a livello dei tessuti nervosi deputati al controllo delle interazioni centro-periferia provocano un'alterazione della normale comunicazione tra SNC e sistema immunitario. Inoltre, a causa della rottura della barriera emato-encefalica, le citochine prodotte dal tessuto cerebrale danneggiato, diffondono nel circolo e inducono una risposta infiammatoria sistemica [34].

Lo scambio di informazione tra cervello e sistema immunitario si realizza con il coinvolgimento di vie neurali e umorali e permette al SNC di monitorare e modulare la risposta infiammatoria periferica (Figura 3). Durante danno cerebrale, le vie immunomodulanti, che sono l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, il sistema nervoso autonomo simpatico e il nervo vago, vengono attivate in modo incontrollato. L'asse *ipotalamo-ipofisi-surrene* è una via neuro-ormonale fondamentale per la regolazione della funzione immunitaria. In risposta a stimolo infiammatorio, specifici neuroni del nucleo paraventricolare ipotalamico sintetizzano CRH che stimola nell'ipofisi anteriore la sintesi dell'ACTH. Tale ormone induce il rilascio dei glucocorticoidi, ormoni immunosoppressivi in grado di inibire la trascrizione di

mediatori pro-infiammatori, influenzare il ciclo cellulare e la motilità di macrofagi, eosinofili, monociti e neutrofili e indurre l'apoptosi in eosinofili e linfociti T immaturi. *Il sistema nervoso autonomo simpatico (SNS)* ha un duplice ruolo nella regolazione dell'infiammazione, in quanto media sia attività pro- che anti-infiammatorie. La base biologica di tale proprietà consiste nella tipologia dei recettori periferici coinvolti. Infatti, l'attivazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici inibisce la produzione di mediatori pro-infiammatori nelle cellule immunitarie, mentre la stimolazione dei recettori  $\alpha$ 2-adrenergici è associata ad amplificazione dell'infiammazione. La funzione immunitaria viene modulata dal sistema simpatico non soltanto a livello cellulare, ma anche negli organi linfoidi primari e secondari (timo, midollo osseo milza, linfonodi, tratto gastrointestinale, fegato). Inoltre, la segnalazione neurale adrenergica induce nelle ghiandole surrenali la sintesi delle catecolamine, le quali, una volta rilasciate in circolo, agiscono come veri e propri ormoni.

Infine, recentemente è stato scoperto che la stimolazione del nervo vago è in grado di modulare la risposta infiammatoria locale e sistemica [35]. Le prime osservazioni riguardanti la *via anti-infiammatoria colinergica* derivano da studi effettuati su modelli sperimentali di endotossemia, in cui la stimolazione elettrica delle fibre vagali ha inibito la produzione di  $\text{TNF-}\alpha$  e ha ritardato lo sviluppo dello shock, mentre la vagotomia ha aumentato la produzione di  $\text{TNF-}\alpha$  sierico ed epatico [36]. Considerando che le fibre efferenti vagali innervano gli organi periferici (sistema reticolo-endoteliale, fegato, polmone, milza, reni, intestino, cuore) e che la trasmissione delle informazioni attraverso il vago è molto rapida, la via colinergica sembra essere la via di elezione attraverso la quale il SNC modula diversi aspetti dell'infiammazione periferica in modo rapido e mirato [38]. L'azione anti-infiammatoria si esplica attraverso l'attivazione, da parte dell'acetilcolina liberata dai terminali nervosi, dei recettori nicotinici contenenti la subunità  $\alpha$ 7 espressi dai macrofagi [37].



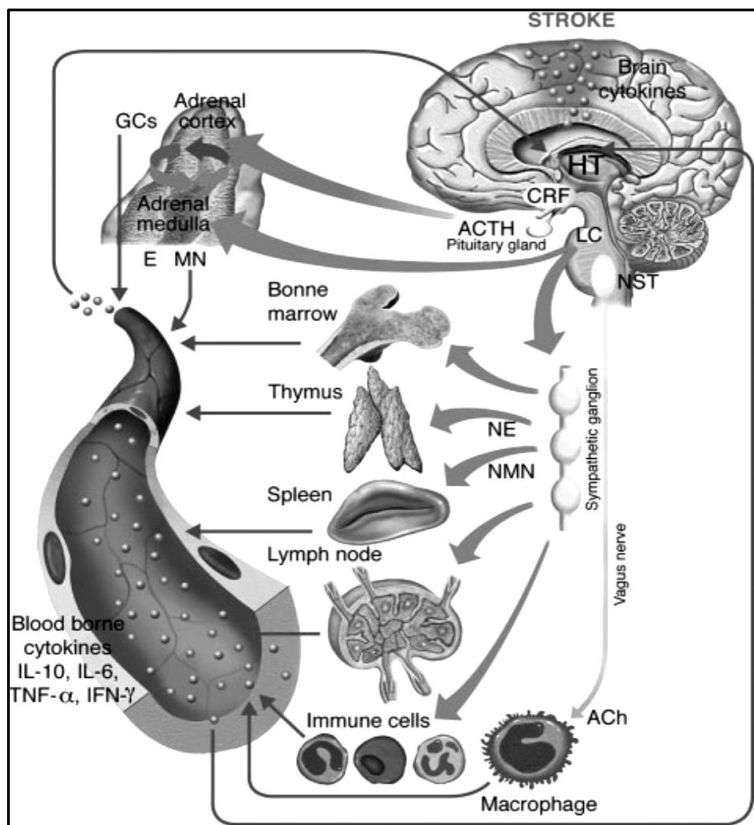


Figura 3 Rappresentazione schematica delle principali vie di comunicazione fra sistema nervoso centrale e sistema immunitario [39]

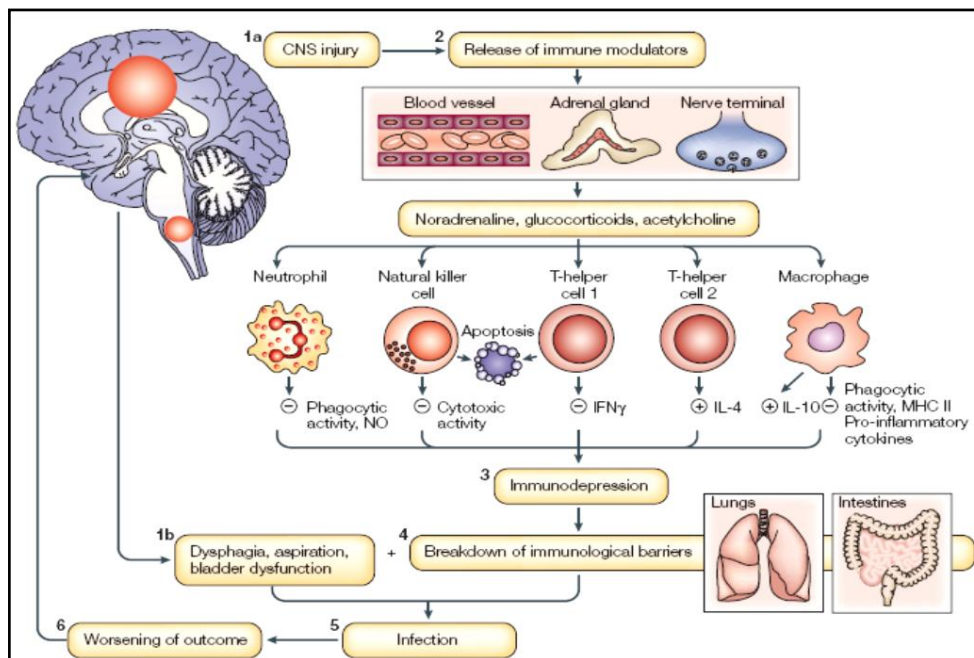
### L'immunodepressione indotta dal danno centrale

L'intensa produzione di citochine nel SNC e il danno a livello dei tessuti nervosi provocano l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, del SNS e del SNP che convogliano segnali anti-infiammatori in periferia (Figura 4). L'attivazione cronica delle fibre simpatiche che innervano gli organi linfoidi secondari causa down-regolazione dell'immunità innata e acquisita, l'apoptosi dei linfociti e l'inattivazione dei monociti. L'esposizione prolungata alle catecolamine è associata a diminuzione del numero totale di linfociti circolanti con aumento della sottopopolazione linfocitaria Th2 rispetto alla Th1 e conseguente inibizione dell'attività pro-infiammatoria Th1. L'attività anti-infiammatoria Th2, invece, non subisce l'influenza inibitoria della via adrenergica in quanto i linfociti Th2 non esprimono i recettori  $\beta$ -adrenergici. Inoltre, le catecolamine plasmatiche inducono nei monociti circolanti la produzione delle molecole anti-infiammatorie IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  [40]. Infine, il danno al SNC può indurre il rilascio di CRH dal nucleo paraventricolare ipotalamico con conseguente attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e produzione di glucocorticoidi. Inoltre

Questi eventi contribuiscono ad indurre uno stato di immunodepressione (CNS-injury-induced immunodepression, CIDS) [32]. Clinicamente, i segni di immunodepressione compaiono già poche ore dopo l'insulto al SNC e perdurano per settimane. L'ischemia cerebrale è associata a una ridotta conta linfocitaria nel sangue periferico, anomalie dell'attività natural killer e dei linfociti T, una riduzione della risposta monocitaria alla stimolazione con mitogeni e citochine in vitro [39]. Sono stati riscontrati anche una compromissione dell'attività natural killer dei linfociti T invariati NK, dei linfociti T citotossici e dei granulociti [41, 42]. Nei pazienti con ESA, anomalie dell'immunità umorale (linfopenia, produzione difettiva di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T, ridotta produzione di mediatori pro-infiammatori) sono evidenti già nel primo giorno post-emorragia [30].

L'aumento della suscettibilità alle infezioni costituisce la conseguenza più comune della CIDS nei pazienti con patologia cerebrale acuta. Le infezioni ricorrenti contribuiscono ad aggravare la prognosi, in quanto predispongono il paziente con danno al SNC allo sviluppo di disfunzioni multi-organo. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che la compromissione dell'immunità cellulo-mediata sembra essere la causa della perdita della capacità di difesa dai patogeni [42, 43]. Esperimenti in vitro hanno indicato che linfociti T derivati da pazienti con danno cerebrale non rispondono ai mitogeni e non producono citochine in seguito a stimolazione, mentre i monociti sono incapaci di rispondere all'endotossina ed esprimono bassi livelli del complesso MHC di classe II e di altre molecole costimolatorie. Inoltre, in un modello sperimentale di ischemia cerebrale, i topi sviluppano spontaneamente infezioni batteriche circa 3 giorni dopo l'insulto ischemico [43]. La somministrazione di linfociti prelevati da topo sano e il blocco della trasmissione adrenergica con propranololo hanno limitato lo sviluppo di infezioni, indicando che esiste una relazione causa-effetto tra soppressione dell'immunità cellulo-mediata e suscettibilità alle infezioni e che l'attivazione incontrollata del SNS è alla base dell'immunodepressione associata a danno cerebrale [41]. Anche in un recente lavoro, la ridotta attività delle cellule T invariati NK associata all'ischemia cerebrale, viene ristabilita dal trattamento con propranololo [42].

Pertanto, l'iperattività del SNS sembra essere la principale causa delle disfunzioni nell'immunità innata anti-batterica e cellulo-mediata che inducono la CIDS. Infine, recentemente, in pazienti con danno cerebrale traumatico è stato rilevato un aumento del tono vagale, causato dall'innalzamento della pressione intracranica. E' stato ipotizzato, quindi, che anche l'attivazione massiva della via anti-infiammatoria colinergica possa contribuire all'induzione della CIDS [44].



*Figura 4 Eventi patofisiologici che predispongono allo sviluppo di infezioni associate a danno cerebrale. L'eccessiva produzione di citochine nel cervello induce l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e del SNS. In seguito al rilascio di noradrenalina e glucocorticoidi, l'immunità innata e acquisita vengono sopresse e si ha rilascio di citochine anti-infiammatorie in circolo. L'immunodepressione e la rottura delle barriere immunologiche favoriscono lo sviluppo di infezioni [32]*

### La flogosi nei tessuti periferici

Studi clinici indicano che in seguito a danno cerebrale si verifica, negli organi periferici, l'attivazione della risposta infiammatoria sistemica e locale. Infatti, in pazienti con patologia cerebrale acuta si osservano frequentemente elevati livelli di citochine nel sangue periferico e nel liquido cefalorachidiano, associati a febbre e leucocitosi [45]. Uno studio retrospettivo su pazienti con ESA ha dimostrato che la SIRS è correlata direttamente all'entità del danno cerebrale [47]. Inoltre, il danno cerebrale traumatico è associato ad un aumento della permeabilità intestinale e dell'espressione di TNF- $\alpha$ , IL-6 e ICAM-1 a livello della mucosa [46].

Sono stati compiuti diversi studi sperimentali per identificare e caratterizzare le reazioni infiammatorie a livello degli organi periferici e cercare di chiarire il meccanismo molecolare che causa l'istaurarsi di tale fenomeno [48]. Tali ricerche sono state condotte in modelli di danno traumatico, ischemia cerebrale e di infiammazione cerebrale indotta mediante l'iniezione centrale di citochine. La tabella 1, riportata di seguito, riassume i risultati ottenuti dall'analisi di fegato, tratto intestinale, polmone e cuore [48].

Il primo dato che emerge riguarda l'induzione della risposta di fase acuta, che sembra essere indipendente dall'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e conseguente alla produzione epatica di chemochine indotta dal danno al SNC [49-51]. Diversi lavori hanno indicato che l'iniezione nel SNC di citochine pro-infiammatorie induce nel fegato la produzione di chemochine che causa reclutamento dei neutrofili a livello epatico, un aumento della conta leucocitaria nel sangue periferico e la conseguente attivazione della risposta di fase acuta. Inoltre, in un modello murino di danno cerebrale acuto, elevati livelli cerebrali di IL-1 hanno attivato una risposta infiammatoria sistemica e, attraverso l'induzione di IL-6, la sintesi epatica delle proteine di fase acuta e delle proteine del complemento [52].

Per quanto riguarda il tratto gastrointestinale, anomalie della funzionalità della barriera e alterazioni istopatologiche della mucosa sono stati descritti in diversi modelli di danno cerebrale traumatico [53, 54]. L'alterazione della barriera intestinale può causare l'assorbimento di endotossina con conseguente amplificazione della risposta di fase acuta. Inoltre, a livello intestinale è stata rilevata l'attivazione di NF- $\kappa$ B e la produzione di mediatori pro-infiammatori [53].

A livello polmonare, sono state osservate alterazioni morfologiche del parenchima, la presenza di infiltrati di macrofagi e neutrofili negli spazi alveolari, un aumento della produzione di leucotriene B<sub>4</sub> e dell'espressione di ICAM-1 [55].

Alterazioni strutturali sono state riscontrate anche a livello cardiaco, sia in modelli di danno traumatico, sia in nell'ESA sperimentale [56].

I meccanismi molecolari alla base dello sviluppo dell'infiammazione periferica dopo danno al SNC non sono ancora del tutto chiariti (Figura 5). Le evidenze sperimentali fanno supporre che la causa principale sia l'iperattività del SNS, che causa rilascio di noradrenalina a livello locale e attivazione dei recettori  $\alpha$ 2-adrenergici espressi dagli immunociti. Studi recenti indicano che catecolamine rilasciate dai terminali sinaptici a livello locale o prodotte dai fagociti residenti nei tessuti sono potenti induttori della risposta infiammatoria [57, 58]. Infatti, la stimolazione di tali recettori  $\alpha$ -adrenergici induce la sintesi di IL-1, TNF- $\alpha$  IL-6 e IL-8, molecole che richiamano leucociti e neutrofili e danno inizio alla risposta infiammatoria. Anche la sintesi epatica di chemochine sembra essere indotta dall'attivazione dei recettori  $\alpha$ 2-adrenergici espresse nelle cellule di Kupffer [58].

Per quanto riguarda l'alterazione della barriera intestinale, essa sembra essere conseguente all'ipoperfusione causata da vasocostrizione dell'arteria mesenterica indotta dall'iperattività del SNS.

Brain lesion	Extra-brain damage	Ref
<b>APR</b>		
IL-1b i.c.v. injection, chronic IL-1b expression, rat	Hepatic TNF-a and CINC-1 production Neutrophil infiltration into liver Leukocytosis	(Campbell et al., 2003)
TNF-a i.c.v. injection, rat	Hepatic CCL-2, CINC-1	(Campbell et al., 2005)
Spinal cord compression, rat	Hepatic chemokines (CCL-2, CINC-1) Neutrophils and monocytes infiltration, leukocytosis	(Campbell et al., 2005)
<b>Gastrointestinal tract</b>		
Percussion injury, rat	↓ Villous height, crypt depth and surface area Histological changes in ileum ↓ Ileal barrier function	(Feighery et al., 2008)
Parietal brain contusion, rat	Mucosa histopathological alterations Epithelial cell apoptosis, loss of tight junction, mitochondrial damage ↓ Intestinal barrier function Apoptosis of epithelium cells	(Hang et al., 2005; Hang et al., 2003) (Hang et al., 2007)
Subarachnoid hemorrhage, rabbit	↑ Proinflammatory cytokines (TNF-a, ICAM-1) Leukocytes infiltration to the intestinal mucosa Mucosa morphological changes	(Zhou et al., 2007)
<b>Lung</b>		
Brain contusion, rat	↑ leukotriene B4 (LTB4) Leukocyte infiltration	(Kalsotra et al., 2007)
Intracerebral hemorrhage, rat	↑ ICAM-1 and tissue factor	(Wu et al., 2006)
<b>Heart</b>		
Brain contusion, rat	↑ ROS Myocytolysis	(Ozsisik et al., 2004)
Subarachnoid hemorrhage, rat	Heart dilated, coagulative myocytolysis, loss of myocardial tissue	(Lin et al., 2008)
<b>Immune system</b>		
Reversible middle cerebral artery occlusion, mouse	Lymphocyte apoptosis, lymphopenia ↓ NK and T cell responses Th1/Th2 cytokine production shift ↑ TNF-a, IFN-g, IL-6, MCP-1, IL-2, chemokines and CCR in splenocytes and T cells from blood and lymph nodes	(Prass et al., 2003) (Offner et al., 2006)
IL-1b lateral ventricle infusion, rat	↓ Natural killer cell activity (↓ response to phytohemagglutinin and ↓ IL-2)	(Sundar et al., 1989)
Subdural Forgarty-catheter inflation, rat	↑ immunosuppressive IL-10 produced by monocytes	Woiciechowsky et al., 1998;
IL-1b i.c.v. infusion, rat	↑ Peripheral neutrophils Lymphopenia	(Woiciechowsky et al., 1999)

*Tabella 1 Riperussioni periferiche del danno centrale riscontrate nei modelli sperimentali [48]*

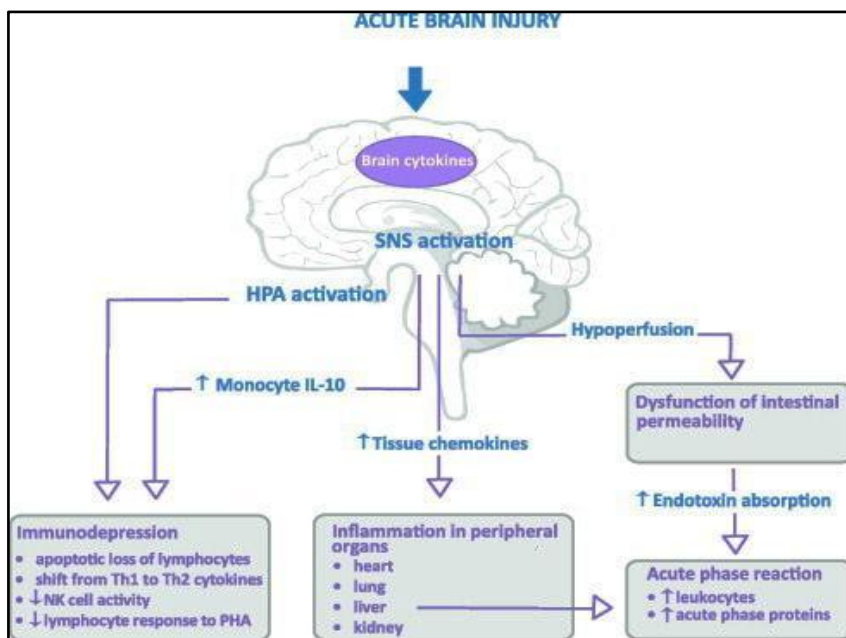


Figura 5 Il danno cerebrale acuto esercita effetti deleteri sulle cellule periferiche e attiva la risposta di fase acuta. L'attivazione del SNS, oltre ad indurre immunodepressione, è causa di infiammazione tissutale, attraverso la stimolazione dei recettori  $\alpha 2$ -adrenergici [48]



## **1.2.LE MELANOCORTINE**

I peptidi melanocortinici furono inizialmente identificati per la loro capacità di promuovere la melanogenesi. Nelle ultime 2 decadi, la ricerca scientifica in questo campo ha progressivamente descritto le proprietà delle melanocortine, che si sono rivelate essere molecole pleiotropiche in grado di modulare le risposte di difesa dell'ospite, di controllare il metabolismo energetico, le funzioni autonome e la secrezione esocrina. Una proprietà rilevante è rappresentata dalla capacità di modulare le risposte del sistema immunitario. Infatti, l'esposizione a stress, patogeni, UV induce nell'ospite la produzione dei peptidi melanocortinici i quali regolano la reazione dell'organismo agli stimoli esterni sia attraverso l'azione diretta su cellule responsive sia mediante l'attivazione di circuiti endogeni anti-infiammatori [59, 60]. Le melanocortine e recettori melanocortinici sono parte integrante di un sistema immunomodulante endogeno che modula le reazioni patologiche o eccessive dell'ospite allo scopo di ristabilire l'equilibrio omeostatico dell'organismo [59].

### 1.2.1. I PEPTIDI MELANOCORTINICI E I RECETTORI MCR

I peptidi melanocortinici derivano dal processamento post-traduzionale del precursore pro-opiomelanocortina (POMC) ad opera di specifiche endopeptidasi denominate pro-proteina convertasi (PC). L'espressione del trascritto di POMC viene indotta da stimoli infiammatori, stress e traumi a livello del sistema nervoso centrale e periferico, in cellule del sistema immunitario, in cellule endoteliali, cheratinociti e melanociti. Una volta tradotta, la POMC, se processata dall'enzima PC1, dà origine all'*ormone Adrenocorticotropo (ACTH)* e alla  $\beta$ -lipotropina, mentre gli ormoni  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -*melanocito-stimolante* ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -*MSH*) e la  $\beta$ -endorfina vengono generati in seguito al clivaggio operato dall'enzima PC2 (Figura 6). La diversa espressione tessutale e temporale degli enzimi PC1 e PC2 conferisce una specificità al processamento della POMC.

Le melanocortine esercitano le loro funzioni mediante la stimolazione dei recettori melanocortinici (MCR), recettori a 7 domini transmembrana (classe A) accoppiati alle proteine G. La stimolazione degli MCR attiva l'adenilato ciclasi e la produzione di AMP ciclico (cyclic AMP, cAMP), con conseguente attivazione della proteina chinasi A (protein kinase A, PKA) e di altre vie di segnalazione cAMP-dipendenti. Esistono 5 sottotipi recettoriali (MC1R-MC5R) con differente distribuzione tessutale; MC3R e MC4R sono prevalentemente espressi a livello del SNC [61], mentre MC1R, MC2R e MC5R si trovano in cellule del sistema immunitario, in fibroblasti, cellule endoteliali, microglia, astrociti, cheratinociti e melanociti [62].

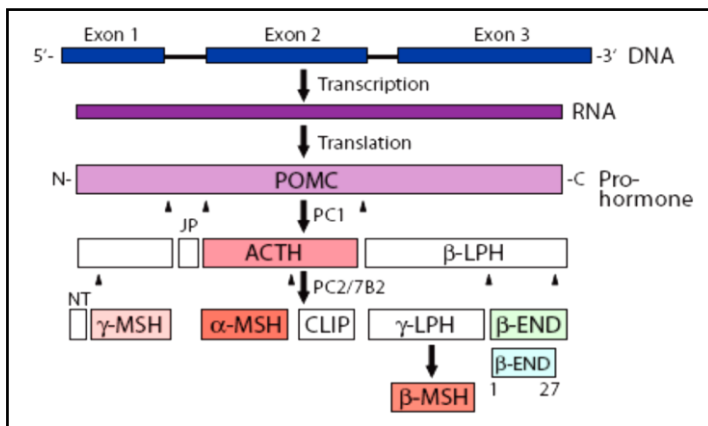
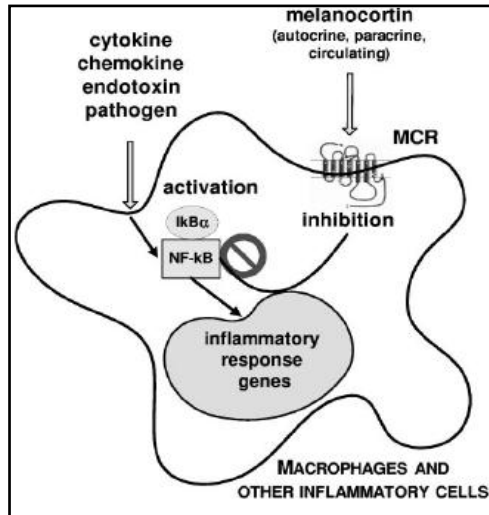


Figura 6 ACTH e  $\alpha$ -MSH derivano dal processamento post-traduzionale della pro-opiomelanocortina ad opera delle endopeptidasi proproteina-convertasi (PC)

### 1.2.2. PROPRIETÀ ANTI-INFIAMMATORIE DELLE MELANOCORTINE

Fin dai primi studi sull'attività delle melanocortine, e in particolare di  $\alpha$ -MSH, è apparso chiaro come questi peptidi siano in grado di inibire, in cellule responsive, l'espressione di citochine, chemochine e di altri mediatori dell'infiammazione [63]. Poiché i recettori melanocortinici sono espressi in diversi tipi cellulari, tale effetto protettivo viene esercitato sia in cellule del SNC sia in cellule periferiche [61, 64]. Le proprietà anti-infiammatorie delle melanocortine derivano in maniera prevalente dalla capacità di queste molecole di ridurre l'attivazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. Come già accennato in precedenza, NF- $\kappa$ B induce l'espressione di mediatori cruciali per l'inizio e l'amplificazione della risposta infiammatoria (citochine, molecole di adesione, chemochine, MHC I e II, NO sintetasi, ciclo-ossigenasi), per l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare. Nello stato di inattivazione, NF- $\kappa$ B si trova nel citoplasma complessato alla proteina inibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ ; il legame con tale molecola, impedisce la traslocazione di NF- $\kappa$ B al nucleo, regolandone l'attività [15]. Stimoli quali stress, ischemia, traumi o patogeni attivano una serie di eventi a cascata il cui risultato finale è la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  e la sua degradazione nel proteasoma, cui segue la traslocazione nel nucleo di NF- $\kappa$ B e il legame a specifiche sequenze (NF- $\kappa$ B–response elements) presenti nei promotori dei geni target. In cellule responsive, la stimolazione di un recettore melanocortinico durante la risposta infiammatoria induce una serie di eventi molecolari che portano all'attivazione di pathway cAMP dipendenti e alla protezione di I $\kappa$ B $\alpha$  dalla degradazione. L'attivazione di un MCR modula, pertanto, l'attivazione di NF- $\kappa$ B (Figura 7) [59]. La modulazione dell'attività di NF- $\kappa$ B ha un'ampia influenza su diversi aspetti del processo infiammatorio, tra cui la produzione di mediatori flogistici, la migrazione degli immunociti e la regolazione della permeabilità vascolare. Gli effetti inibitori delle melanocortine sulla risposta infiammatoria sono stati studiati *in vitro* e *in vivo*.



*Figura 7 Effetti anti-infiammatori delle melanocortine sugli immunociti. L'interazione tra melanocortine e MCR previene la traslocazione al nucleo di NF- $\kappa$ B indotta da citochine, endotossina e altri stimoli infiammatori. La soppressione dell'attività di NF- $\kappa$ B avviene mediante produzione di cAMP e attivazione di pathway cAMP dipendenti che inibiscono la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  [59]*

### **1.2.2.1. Effetti anti-infiammatori *in vitro***

Ricerche condotte *in vitro* hanno dimostrato che le melanocortine sono in grado di modulare la produzione di mediatori infiammatori in immunociti, cellule endoteliali, epiteliali e neurali [62]. In particolare, i monociti, per il loro ruolo cruciale nello sviluppo e nell'amplificazione della risposta infiammatoria, rappresentano bersagli significativi dell'attività anti-infiammatoria delle melanocortine [59]. Esperimenti effettuati utilizzando agonisti sintetici selettivi per uno specifico MCR e studi di immunoneutralizzazione hanno indicato che l'effetto anti-infiammatorio sembra essere mediato principalmente dalla stimolazione di MC1R. Tale recettore è espresso da monociti, macrofagi, linfociti B, cellule dendritiche, neutrofili, astrociti, microglia, cellule endoteliali e fibroblasti [62]. Ulteriori ricerche hanno indicato che in monociti/macrofagi la modulazione della produzione di molecole infiammatorie si realizza anche attraverso l'attivazione dei recettori MC3 e MC5 [59]. In considerazione di ciò, è stato ipotizzato che l'effetto anti-infiammatorio dei peptidi melanocortinici sia basato sulla stimolazione di un singolo recettore o di diversi sottotipi recettoriali a seconda delle condizioni fisiologiche o patologiche dell'ospite.

### **1.2.2.2. Effetti protettivi e anti-infiammatori in vivo**

Le proprietà anti-infiammatorie e protettive delle melanocortine sono state estesamente studiate in modelli animali di patologie localizzate e sistemiche, quali artrite reumatoide, encefalite, sepsi, infiammazione intestinale, shock emorragico, danno da ischemia/riperfusion renale e cardiaca, infiammazione epatica e trapianto d'organo [62, 64-71]. Tali studi hanno sistematicamente mostrato la marcata influenza modulante delle melanocortine sulla produzione di mediatori infiammatori e sulla funzionalità leucocitaria. Una delle osservazioni sperimentali più frequenti riguarda la diminuzione dell'infiltrato leucocitario a livello del tessuto infiammato in animali trattati con melanocortine rispetto al gruppo controllo. Accanto alla modulazione della migrazione degli immunociti, si evidenzia una ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie, quali TNF- $\alpha$  e IL-6, di NO e di chemochine, sia a livello tissutale che plasmatico. Ulteriormente, studi effettuati nel trapianto sperimentale d'organo e nel danno polmonare acuto, hanno indicato che la somministrazione di  $\alpha$ -MSH sopprime significativamente l'espressione di E-selectine, ICAM-1 e VCAM-1.

Anche in modelli di *infiammazione e danno cerebrale*, il trattamento con melanocortine ha ridotto la produzione di citochine, chemochine e NO e la migrazione di cellule infiammatorie [72-75]. L'inibizione della sintesi di citochine si ottiene altresì in cellule del tessuto nervoso stimulate con LPS in vitro. Ulteriormente, ricerche recenti in modelli di ischemia globale e focale hanno documentato un effetto protettivo contro le reazioni eccitotossiche, apoptotiche e lo stress ossidativo [76, 77]. Tali studi hanno fornito delle indicazioni riguardo alla finestra terapeutica entro cui effettuare il trattamento, dimostrando che la somministrazione di melanocortine 18 ore dopo l'insulto centrale è in grado di esercitare un marcato effetto neuroprotettivo. Ricerche recenti hanno indicato che il trattamento con  $\alpha$ -MSH è associato ad un incremento del recupero funzionale e cognitivo dopo ischemia [73, 76, 77]. Pertanto, le melanocortine, oltre a modulare l'espressione di mediatori pro-infiammatori a livello del SNC, sono in grado di esercitare un effetto neuroprotettivo anche a lungo termine.

Tali influenze ad ampio spettro probabilmente si realizzano grazie alla presenza di 3 sottotipi recettoriali nel SNC: MC1R, espresso soprattutto da cellule gliali, astrociti, cellule endoteliali, MC3R e MC4R, espressi nel tessuto nervoso [61].

### **1.2.3. CIRCUITI ANTI-Infiammatori Endogeni Basati sulle Melanocortine**

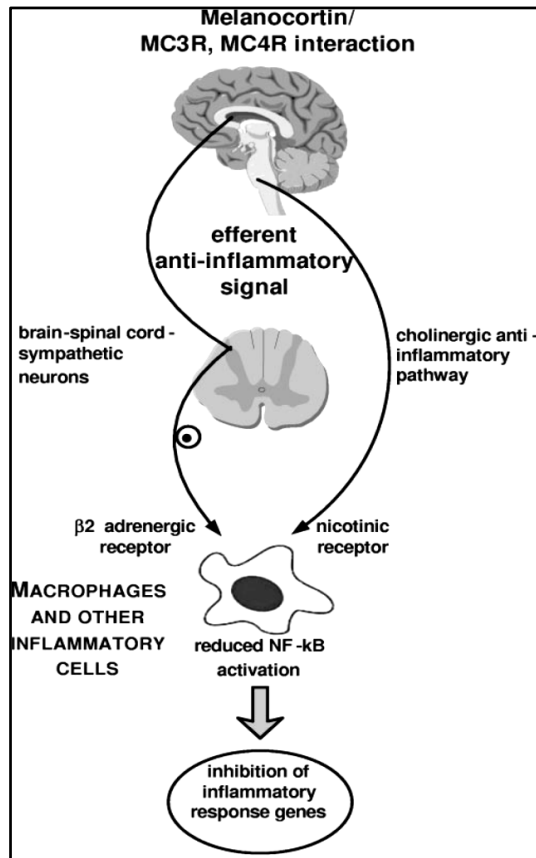
Come già trattato in precedenza, il SNC modula le funzioni immunologiche periferiche mediante l'attivazione di vie neurali e umorali. I peptidi melanocortinici e i loro recettori sono parte integrante di tali circuiti endogeni immunomodulanti e protettivi. Infatti, infezioni, danni, stress e mediatori pro-infiammatori inducono, a livello centrale, l'espressione e il processamento della POMC. Una volta tradotta, la POMC viene clivata da PC2 a dare  $\alpha$ -MSH (1-13) nella pars distalis dell'ipofisi e nei neuroni del nucleo arcuato e paraventricolare ipotalamici, mentre nell'ipofisi anteriore si ha la produzione di ACTH. Le melanocortine così prodotte vengono rilasciate a livello dei terminali melanocortinergici e, attraverso la stimolazione di MC3R e MC4R, influenzano la risposta febbrile e attivano vie neurali discendenti che modulano l'espressione genica degli immunociti. La produzione endogena di melanocortine, quindi, contribuisce a regolare le reazioni dell'ospite agli stimoli esterni (Figura 8) [59].

Studi clinici hanno mostrato che quando tale produzione in risposta ad uno stress non avviene o è insufficiente, la patologia in atto progredisce in modo più severo [78]. Diversi studi hanno fornito le indicazioni sperimentali a conferma di questa ipotesi. Infatti, in un modello di endotossiemia, l'immunoneutralizzazione di  $\alpha$ -MSH endogeno è associata ad una più marcata flogosi polmonare ed epatica [79].

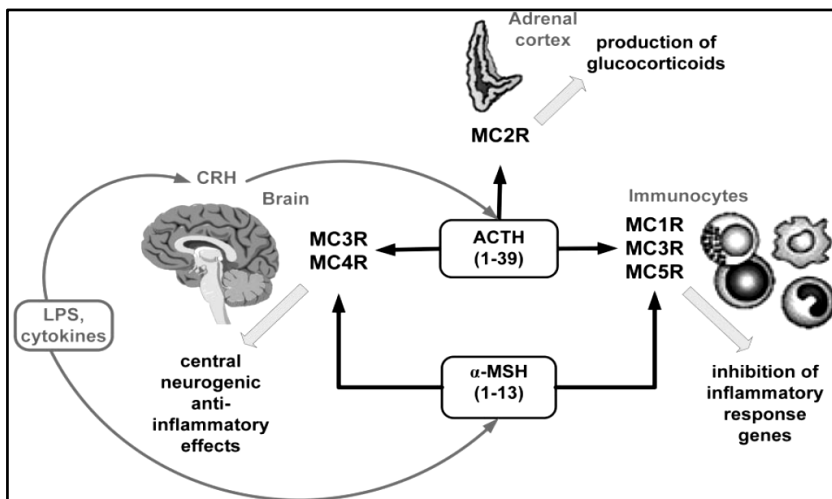
Evidenze sperimentali hanno indicato che i segnali che originano nel SNC in seguito all'attivazione di MC3R e MC4R vengono convogliati in periferia attraverso l'attivazione di vie adrenergiche e colinergiche (Figura 8). Infatti, in un modello murino di infiammazione dermica acuta, la resezione del midollo spinale e il trattamento con propanololo hanno prevenuto l'azione inibitoria di  $\alpha$ -MSH *in vivo*, indicando che tale effetto sembra essere mediato da una via simpatica che attiva recettori  $\beta_2$  adrenergici periferici [80, 81]. Esperimenti recenti effettuati in modelli di shock emorragico, di danno da ischemia/riperfusionne cardiaca e di ischemia cerebrale, in cui la vagotomia bilaterale e il blocco della trasmissione vagale con atropina solfato hanno inibito gli effetti protettivi delle melanocortine, dimostrano che tali molecole sono in grado di attivare anche la via anti-infiammatoria colinergica [60, 71, 82, 83].

L'ACTH, oltre ad attivare i recettori espressi a livello centrale e negli immunociti, è in grado di stimolare MC2R nella corticale del surrene, e di indurre la produzione dei glucocorticoidi, attivando, quindi, una risposta anti-infiammatoria sistemica. Pertanto, questo ormone è al centro di un importante circuito anti-infiammatorio endogeno, in quanto è in grado di stimolare vie anti-infiammatorie neurali e sistemiche e modulare l'espressione genica delle cellule del sistema immunitario (Figura 9) [62].





*Figura 8 Vie anti-infiammatorie neurali attivate dalle melanocortine. Oltre agli effetti anti-infiammatori diretti sugli immunociti, le melanocortine, attraverso la stimolazione di MCR cerebrali, attivano vie adrenergiche e/o colinergiche che trasmettono segnali anti-infiammatori in periferia [59]*



*Figura 9 Circuiti anti-infiammatori basati su  $\alpha$ -MSH e ACTH. Gli effetti di  $\alpha$ -MSH si esercitano attraverso l'attivazione dei recettori MC1, MC3 e MC5 espressi dalle cellule periferiche presenti nel sito d'infiammazione, e dei recettori MC3 e MC4 nel SNC [59]. ACTH, attraverso la stimolazione di MC2R nella corticale del surrene, è in grado di indurre anche una risposta anti-infiammatoria sistemica con produzione di glucocorticoidi.*

### ***1.2.3.1. Controllo dell'infiammazione periferica attraverso l'attivazione di vie melanocortinergiche centrali***

Un aspetto unico del trattamento anti-infiammatorio basato sull'uso delle melanocortine è rappresentato dalla possibilità di attivare le vie neurali per convogliare segnali anti-infiammatori ai tessuti periferici. L'attivazione di tali vie immunomodulanti potrebbe rappresentare un'innovativa possibilità di terapia della flogosi. Diversi esperimenti hanno mostrato che la somministrazione centrale di melanocortine sintetiche, attraverso la stimolazione dei recettori MC3 e MC4 cerebrali e la conseguente attivazione delle vie neurali immunomodulanti, modula l'infiammazione periferica. In un primo studio condotto per indagare la capacità di modulazione delle interazioni centro-periferia delle melanocortine, l'iniezione centrale di  $\alpha$ -MSH ha inibito l'infiammazione e l'edema indotti nell'orecchio da IL-1 e leucotrieni [84, 85]. In un modello di endotossiemia,  $\alpha$ -MSH intracerebroventricolare ha ridotto l'infiammazione sistemica e inibito l'attività della Nos2 nel polmone e nel fegato [79]. Nella stessa ricerca, il trattamento con  $\alpha$ -MSH ha esercitato effetti molto più blandi in animali con resezione del midollo spinale, indicando che l'attivazione delle vie neurali immunomodulanti è uno dei meccanismi mediante cui le melanocortine esercitano l'azione anti-infiammatoria.

Oltre a ridurre la produzione dei mediatori dell'infiammazione, l'attivazione delle vie neurali melanocortinergiche esercita effetti modulatori più ampi sul sistema immunitario. Infatti, in un modello di immunodepressione associata ad infiammazione cerebrale,  $\alpha$ -MSH somministrato centralmente ha bloccato gli effetti immunosoppressivi della IL-1 icv [86]. Inoltre, melanocortine icv hanno inibito l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e la soppressione dell'attività NK conseguenti a iniezione centrale di IL-1 [87].

Infine, recenti studi effettuati in modelli di danno da ischemia/riperfusion e di shock emorragico hanno indicato che l'iniezione centrale di ACTH (1-24), attraverso l'attivazione della via colinergica, esercita effetti protettivi e anti-shock negli organi periferici [83].

## **2.SCOPO DEL LAVORO**

L'obiettivo generale della presente ricerca è proporre un nuovo approccio terapeutico per il trattamento dell'ESA al fine di migliorare la prognosi del paziente.

Gli scopi specifici di questa ricerca sono:

1. Identificare e caratterizzare le modificazioni molecolari precoci e tardive indotte dall'ESA nell'arteria basilare e negli organi periferici (milza, fegato e intestino);
2. Valutare l'efficacia della terapia con peptidi melanocortinici nel contrastare il vasospasmo e le ripercussioni periferiche associate all'ESA.

### **3.PIANO SPERIMENTALE**

Questo studio è articolato in 3 fasi:

1. La prima parte di questa ricerca è stata dedicata alla messa a punto e all'ottimizzazione di un modello sperimentale di ESA nel ratto;
2. Una volta standardizzata l'esecuzione del modello sperimentale, si è proceduto allo studio molecolare del fenotipo dell'arteria basilare e delle repercussions negli organi periferici. Le valutazioni sperimentali sono state effettuate:
  - a. dopo 4 ore dall'iniezione di sangue per studiare le modificazioni precoci;
  - b. dopo 5 giorni dall'induzione dell'ESA per valutare la presenza e l'entità del vasospasmo e l'attivazione della risposte a lungo termine epatiche;
3. Nella terza fase dello studio verrà valutata l'efficacia terapeutica dei peptidi melanocortinici.

## **4. MATERIALI E METODI**

### **4.1. PROCEDURA CHIRURGICA**

In questo studio sono stati utilizzati ratti CD IGS (International Genetic Standard) maschi, dal peso compreso tra 300 e 350 gr (Charles River, Calco, Italia). Gli animali sono stati mantenuti presso il Centro di Ricerche Chirurgiche Precliniche (Fondazione IRCCS "Ca'Granda" Ospedale Maggiore Policlinico) sotto condizioni standard di temperatura, umidità e luce tempo-regolata. Acqua e cibo sono stati forniti secondo necessità nel periodo pre e post-operatorio. Tutti gli animali hanno ricevuto trattamenti in conformità ai Principles of Laboratory Animal Care, formulati dalla National Society of Medical Research, e alla Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, preparata dalla National Academy of Sciences e pubblicata dai National Institutes of Health (Pubblicazione NIH No. 86-23, revisionata nel 1985).

In collaborazione con il Centro di Ricerche Chirurgiche Precliniche, è stato messo a punto un modello sperimentale di ESA nel ratto. Tale modello si basa su una singola iniezione di sangue autologo nella cisterna magna. Abbiamo optato per questo modello iperacuto in quanto ci è parso più idoneo allo studio delle modificazioni molecolari e fenotipiche che avvengono a livello della parete arteriosa nelle fasi immediatamente successive all'insulto emorragico.

E' stata utilizzata una pre-anestesia in camera Fluovac (Harvard Apparatus, Holliston, MA) con somministrazione di miscela aerea di Isoflurane (Abbott, Abbott Park Road, IL), nitrossido di azoto e ossigeno, a cui è seguita la somministrazione per via intraperitoneale di midazolam e chetamina per l'anestesia. E' stato quindi somministrato a livello intramuscolare fentanyl. I ratti sono stati lasciati respirare in aria su di un piano termoriscaldato. Successivamente, con tecnica microchirurgica ed in sterilità, attraverso un'incisione inguinale sinistra, sono state isolate l'arteria e la vena femorale dell'animale ed incannulata l'arteria femorale pre-epigastrica con catetere in poliuretano. Gli animali sono stati quindi osservati per periodi variabili prima di indurre l'ESA per valutare parametri fisiologici quali temperatura corporea, frequenza respiratoria e pressione arteriosa (quest'ultima mediante misurazione effettuata con Biopac System (2 Biological Instruments, Varese, Italia), attraverso il catetere inserito nell'arteria femorale pre-epigastrica) e stimare il livello di anestesia ottenuta. Sono state inoltre eseguite per ciascun animale emogasanalisi per valutare l'equilibrio acido-base e i livelli di elettroliti nel sangue in diversi momenti dell'esperimento. I ratti sono stati successivamente posizionati su di un lettino appositamente costruito per mantenere la testa flessa, ottenendo un aumento del diametro rostro-caudale della membrana atlanto-occipitale. A questo punto, con tecnica percutanea, è stata punta la membrana atlanto-occipitale utilizzando microaghi appositamente tarati che impedissero un danno diretto del tronco encefalico o del cervelletto. Dopo verifica dell'effettiva fuoriuscita di liquido cefalo-rachidiano, sono stati inseriti in cisterna magna 200  $\mu$ l di sangue autologo arterioso prelevato attraverso il catetere femorale; l'iniezione è avvenuta in 3 minuti. Gli animali sono stati quindi mantenuti in posizione verticale con la testa rivolta verso il basso per 15 minuti allo scopo di mantenere il sangue immesso a livello di cisterne della base. Nel periodo post-induzione dell'ESA gli animali sono stati mantenuti su di un piano termoriscaldato e sono state ripetute in diversi

momenti le valutazioni dei parametri fisiologici misurati in precedenza, così come i prelievi arteriosi per le emogasanalisi.  
L'intervento sham consiste in prelievo e reinfusione di 100  $\mu$ l di liquor cefalo-rachidiano.

#### **4.2.PROTOCOLLI SPERIMENTALI, TRATTAMENTI E CAMPIONAMENTO**

Sono stati scelti 2 tempi di sacrificio: a 4ore dall'iniezione di sangue per lo studio in acuto; a 5 giorni per la valutazione a lungo termine.

Per ogni tempo di sacrificio, i gruppi (N=9) sono stati così suddivisi: A) gruppo basale; B) gruppo sham (puntura della cisterna magna senza induzione di ESA); C) gruppo con ESA; D) gruppo con ESA trattato con melanocortine. Il gruppo basale include ratti non sottoposti ad alcuna procedura e sacrificati al giorno 0. Il trattamento con melanocortine è stato effettuato utilizzando il peptide sintetico [Nle4-dPhe7]-MSH (NDP-MSH), analogo più stabile e più potente del peptide naturale  $\alpha$ -MSH. I ratti dei gruppi D) e C) sono stati sottoposti a iniezione i. v. di una dose di 300  $\mu$ g/Kg di melanocortina o di un egual volume di soluzione salina ogni 12 ore dal giorno 1 fino al sacrificio.

Gli animali assegnati all'analisi molecolare sono stati sacrificati con CO<sub>2</sub> e decapitati; l'arteria basilare e le biopsie degli organi periferici sono stati congelati in azoto liquido. Il sangue è stato prelevato dalla vena cava e centrifugato a 1200 rpm, per 15' a 4°C, su centrifuga Hereaus Multifuge X3R (Hereaus GmbH, Hanau, Germania) per la separazione del plasma. I ratti assegnati all'analisi istologica dell'arteria basilare sono stati anestetizzati con una miscela intraperitoneale contenente ketamina (100mg/kg) e midazolam (1mg/kg). E' stata quindi effettuata un'incisione xifopubica e, dopo identificazione della linea alba, aperto il peritoneo. Dopo divaricazione della matassa intestinale sono state identificate l'aorta e la vena cava inferiore dell'animale. Sono state quindi isolate ed è stata incannulata l'aorta, legandola distalmente. E' stata quindi legata anche la vena cava inferiore a livello prossimale ed è stata effettuata un'incisione a livello più distale per permettere la fuoriuscita del sangue refluo. A questo punto è stata connessa l'agocannula ad una sacca contenente 500 ml di isotonic phosphate-buffered saline (PBS) e posizionata a 150 cm dal livello del cuore dell'animale per ottenere un'adeguata perfusione degli organi periferici. Al termine della perfusione di 500 ml di PBS, della durata di circa 15 minuti, è stata effettuata la fissazione attraverso infusione continua a 150 cm dal livello del cuore dell'animale di 500 ml di paraformaldeide 4% in PBS, pH 7.4. Gli encefali fissati sono stati prelevati e lasciati in paraformaldeide al 4% per almeno 48 ore.



### **4.3. ESTRAZIONE DI RNA E RETROTRASCRIZIONE A CDNA**

Le arterie basilari sono state processate utilizzando il kit RNeasy Micro (Qiagen, Valencia, CA), che permette di ottenere da un unico campione sia una soluzione di RNA totale sia una preparazione proteica. Questa tecnologia combina la proprietà selettive di legame delle membrane in silice per l'RNA con la velocità e riproducibilità (in termini di resa di estrazione e purezza del RNA ottenuto) della tecnologia microspin. La procedura prevede la lisi del campione in un buffer contenente guanidina-tiocianato e  $\beta$ -mercaptoetanol per denaturare l'enzima Rnasi eventualmente presente. Il lisato così ottenuto viene addizionato ad etanolo 70% e caricato in colonna per permettere il legame del RNA presente alla membrana in silice e la separazione dai restanti componenti cellulari (membrane lipidiche, proteine, DNA).

Date le ridotte dimensioni del campione biologico di partenza è stato necessario creare dei pools composti dalle arterie basilari di diversi animali appartenenti al medesimo gruppo di trattamento. Attraverso una fase preliminare di prove si è provveduto a determinare il numero minimo di arterie basilari necessarie per ottenere una quantità di RNA sufficiente e di qualità adeguata per le successive indagini di biologia molecolare. La numerosità ottimale per la composizione dei pool è risultata di 3 arterie basilari per gruppo sperimentale, programmando per la fase successiva per ciascun gruppo di trattamento costituito da 9 animali, 3 pools.

Le 3 arterie basilari sono state perciò riunite in un tubo sterile da 2 ml e omogenate in buffer RLT fornito utilizzando un omogenizzatore MICCRA D-1 (Labortechnik GmbH, Wasserburg, Germania) con punta da 5 mm che consente l'utilizzo del volume minimo di soluzione per la lisi (400  $\mu$ l). I campioni sono poi stati centrifugati a 12000 rpm su Biofuge Pico (Heraeus) a temperatura ambiente per 3'. Al surnatante sono stati aggiunti 400 microl di Etanolo 70% (SIGMA, St. Louis, MO) e la soluzione ottenuta è stata caricata su colonna RNeasy MinElute e centrifugata a 10000 rpm per 15". Dopo un primo lavaggio della membrana è stato effettuato un trattamento con Dnase I (15' a TA) per rimuovere le eventuali tracce di DNA rimaste dopo lo step di binding. Dopo 3 successive fasi di lavaggio si è proceduto al recupero del RNA dalla colonna mediante l'eluizione con 14 microl di acqua RNasi-free. L'RNA ottenuto è stato quantificato mediante lettura su spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf, Hauppauge, NY) e l'integrità è stata verificata mediante elettroforesi su gel denaturante d'agarosio.

L'estrazione di RNA dagli organi periferici è stata effettuata utilizzando un ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Carlsbad, CA): questo strumento sfrutta un processo di separazione del RNA da DNA e proteine e permette di processare quantità di materiale maggiore ottenendo alte rese, grazie alla possibilità di caricare i campioni in piastre di estrazione da 96 wells. Il tessuto, dopo essere stato pesato, è stato omogenato in Lysis Buffer 1X (un lisante a base di guanidinia) mantenendo un rapporto peso dell'organo/volume di soluzione di 100 mg/ml e utilizzando un Ultra-Turrax tissue homogenizer (Labortechnik GmbH). Il lisato ottenuto è stato trattato con Proteinasi K (Applied Biosystems), alla concentrazione di 20 mg/ml, per 1h a TA. I campioni sono stati successivamente caricati su ABI Prism 6100 per l'estrazione del RNA secondo il protocollo Tissue RNA isolation. Durante il processo di estrazione è stata effettuata una digestione con DNasi I per eliminare l'eventuale DNA contaminante presente. L'RNA ottenuto

per eluizione finale dalla membrana di separazione è stato quantificato e la sua integrità valutata con gel denaturante.

La retrotrascrizione da RNA a cDNA è stata effettuata utilizzando il kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) secondo il protocollo. In breve, in un tubo sterile da 0.2 ml sono stati pipettati 0.3 µg di RNA per le arterie basilari o 2 microg di RNA per gli organi periferici e aggiunta una quantità di acqua DEPC 0.1%, tale da ottenere un volume finale di 25 microl. E' stata preparata una soluzione di retrotrascrizione 2X così costituita: 1) RT Random primers (20 pmol); 2) RT Buffer, 5 µl (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>); 3) Mix di deossinucleotidi trifosfati (dNTP), 2 µl (10 mM ciascuno); 4) Trascrittasi inversa Moloney murine leukemia virus (MMLV), 2.5 µl (200 U/µl); 5) Acqua DEPC 10.5 µl. Al campione è stata aggiunta la soluzione 2X di RT ottenendo un volume finale di 50 µl per provetta. Si è poi effettuata la reazione di retrotrascrizione secondo il seguente protocollo: 10 minuti a 25°C per attivare l'enzima MMLV, 120 minuti a 37°C per il processo di RT e infine 5 secondi a 85°C per denaturare gli ibridi RNA-cDNA e inattivare la trascrittasi inversa. Il cDNA così ottenuto è stato diluito ad una concentrazione finale di 6 ng/µl (arterie basilari) o di 20 ng/µl (organi periferici) aggiungendo 50 µl di acqua DEPC. Il cDNA è stato utilizzato direttamente per la fase di amplificazione oppure conservato a -80°C.

#### **4.4.REAL-TIME PCR**

La PCR (polymerase chain reaction) si basa sull'impiego di un enzima, la Taq Polimerasi, che catalizza la reazione di replicazione in vitro di una particolare sequenza a partire da un template di DNA. Utilizzando la Real-Time PCR è possibile monitorare l'andamento della reazione mentre è ancora in svolgimento. L'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione presente nel campione. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando un termociclatore ABI PRISM 7900 HT-Fast (Applied Biosystem). Per la preparazione delle miscele di reazione è stata utilizzata TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem). I saggi utilizzati sono costituiti da una miscela 20X di primers non marcati e da una sonda TaqMan MGB marcata in FAM. In una provetta contenente 18 ng di cDNA arterie basilari) o 20 ng di cDNA (organi periferici), sono stati aggiunti 15 µl della seguente miscela di reazione: 1) TaqMan Fast Universal PCR MasterMix (2X), 7.5 µl; 2) 20X Taqman Gene expression assays, 0.75 µl; 3) H<sub>2</sub>O Rnase-free (SIGMA, St. Louis, MO), 3.75 µl. I campioni sono stati trasferiti in una piastra da 96 pozzetti e posizionati nel termociclatore 7900 HT-Fast. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in doppio per i campioni e in triplo per gli standard. Ogni ciclo di amplificazione prevede per tutti i geni presi in esame il seguente profilo: uno step iniziale di 20" a 95°C per l'attivazione dell'enzima Taq Polimerasi, seguito da 55 cicli suddivisi in due fasi, la prima di 1" a 95°C per la fase di denaturazione e la seconda di 20" a 60° per le fasi di annealing ed extension.

L'analisi dei grafici di fluorescenza ottenuti con Real-Time PCR è stata effettuata utilizzando il software SDS 2.3 (Applied Biosystems). Nello studio di un grafico di Real-Time PCR, che riporta in ascissa i cicli di amplificazione e in ordinata l'intensità di fluorescenza, vengono definiti 2 parametri: la linea base della fluorescenza (Baseline), che indica il valore al di sopra del quale l'intensità di fluorescenza è specifica e proporzionale all'accumulo dell'amplificato; e la linea soglia (Threshold) che viene scelta in modo da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale di amplificazione. Si ottiene così il ciclo soglia CT (Threshold Cycle), specifico per ogni campione, che identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia. Esiste una relazione lineare tra il valore del ciclo soglia CT e il logaritmo della quantità iniziale di cDNA: maggiore è la quantità di cDNA presente e minore risulta il CT. Infatti, la curva di accumulo dell'amplificato si distacca dalla baseline tanto prima quanto maggiore è la quantità di template di partenza. La quantificazione relativa dell'espressione è stata calcolata mediante il metodo comparativo del  $\Delta CT$  e prendendo in considerazione le efficienze di amplificazione di ogni singola coppia di primers. Per calcolare le efficienze di amplificazione di ogni coppia di primers sono state costruite delle rette di taratura a partire dai grafici di amplificazione ottenuti facendo correndo diluizioni seriali di un campione a concentrazione nota. L'efficienza è stata ricavata a partire dalla pendenza (slope) della curva standard mediante la formula:  $10 - (1/\text{slope})$ . I valori  $\Delta CT$  sono stati calcolati sottraendo dal CT di ogni campione del gene di interesse (GOI) o reference (REF) il CT dello stesso gene del campione calibratore, costituito da uno standard a concentrazione nota. I valori di quantità relativa così ottenuti vengono normalizzati per eliminare le differenze cDNA dovute a procedure tecniche, come la lettura allo spettrofotometro del RNA e l'efficienza della reazione di retrotrascrizione. Tale normalizzazione si

effettua con un fattore calcolato con i CT di differenti geni reference, quantificati sullo stesso cDNA. L'analisi della stabilità dei geni reference e il calcolo del fattore di normalizzazione di ogni campione sono state effettuate mediante l'applet geNorm VBA 3.4.

#### **4.5. STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE TAQMAN LOW-DENSITY ARRAYS (TLDA)**

Utilizzando cards microfluidiche disegnate ad hoc per questa ricerca, sono stati analizzati 90 geni di interesse coinvolti nella risposta infiammatoria, nello stress ossidativo, nei meccanismi di riparo, nella risposta allo stress e nell'apoptosi e 7 geni reference (18s, actb, b2m, hprt, gapdh, rplp2, pgk1). Tali arrays sono stati disegnati in un formato che permette l'analisi quantitativa di 96 saggi di PCR su 4 campioni simultaneamente (2 porte per ciascun campione, 4 porte per card). In ogni porta dell'array sono stati caricati 30ng di cDNA opportunamente miscelati a Taqman Universal PCR Master mix 2X (Applied Biosystems). Le corse di amplificazione sono state effettuate con profilo termico e cicli predefiniti su piattaforma 7900HT (Applied Biosystems). I dati grezzi ottenuti sono stati analizzati in un singolo study utilizzando il software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) e convertiti in CT settando manualmente una threshold ottimale per tutti i campioni analizzati. La baseline è stata invece calcolata mediante analisi automatica. Utilizzando l'applet geNorm VBA 3.4, è stata effettuata l'analisi della stabilità dei 7 geni reference amplificati e il calcolo dei fattori di normalizzazione. L'espressione relativa di ogni campione è stata calcolata applicando il metodo comparativo del DCT.

Una volta ottenute le quantità relative di ogni gene analizzato, è stata effettuata un'analisi non supervisionata per raggruppare i campioni sulla base del profilo di espressione globale e valutare se tali profili definiscono i gruppi sperimentali, è stata effettuata un'analisi non supervisionata utilizzando il software dCHIP (DNA-Chip Analyzer, [www.dChip.org](http://www.dChip.org)). Prima di procedere con la clusterizzazione, i dati di espressione relativa sono stati trasformati in logaritmo in base 2 e ulteriormente normalizzati dal software (dai valori di espressione è stata sottratta la media di tutti i campioni e il risultato ottenuto è stato diviso per la deviazione standard). La costruzione del cluster genico è stata effettuata definendo la distanza metrica tra 2 geni come  $1-r$  dove  $r$  è il coefficiente di correlazione di Pearson tra i valori di espressione standardizzati dei 2 geni su tutti i campioni analizzati. Il metodo di linkage utilizzato si basa invece sul calcolo della media dei valori di espressione (Average linkage). E' stata utilizzata una procedura analoga per analizzare la correlazione fra i campioni di diversi gruppi di trattamento (significant sample cluster analysis, dCHIP). Tale analisi permette di valutare se campioni con le stesse condizioni sperimentali clusterizzano insieme, cioè se presentano pattern di espressione genica simili. Si considera significativa una probabilità  $p < 0.05$ .

Per identificare i geni differenzialmente espressi è stata effettuata un'analisi supervisionata utilizzando il software Significant Analysis of Microarrays (SAM), versione 3.02. Tale software utilizza un metodo non parametrico basato su permutazioni ripetute per determinare se l'espressione di un dato gene differisce in modo non casuale tra i vari gruppi di trattamento. La soglia di significatività è stata determinata scegliendo manualmente un valore  $D$  tale da avere una FDR (false discovery rate) dello 0% ( $q=0$ ). Sono stati inclusi nell'analisi soltanto geni con fold change  $> 2$  fra i gruppi di trattamento.

#### **4.6. WESTERN BLOT**

Le proteine totali sono state recuperate mediante precipitazione in acetone degli eluati ottenuti dalle colonne RNeasy. Brevemente, sono stati aggiunti 4 volumi di acetone a 4°C ad ogni lisato proteico e la miscela così ottenuta è stata incubata a -20°C per 30 min. Al termine del periodo d'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 16000 g per 10 min a 4°C. Il pellet di proteine ottenuto è stato risospeso in un buffer specifico (Biorad, Hercules, CA) addizionato con inibitori di fosfatasi e proteasi (Sigma, Saint Louis, MO). La concentrazione della soluzione proteica è stata determinata mediante saggio BCA (Thermo, Waltham, MA).

25 µg di ogni campione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in SDS-page, seguita da trasferimento su membrana di nitrocellulosa (Biorad, Hercules, CA). Dopo blocking dei siti aspecifici con bloccanti adeguati alla proteina in studio, si è proceduto all'incubazione O/N a 4°C con anticorpi primari (anti-p135, Ser32, 1:500; anti-pp44/42 MAP Kinase, Thr202/Tyr204, 1:500; Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA) e secondario coniugato con perossidasi (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). La rilevazione dei complessi antigeno-anticorpo è stata effettuata con il kit in chemiluminescenza Advanced Western Blotting System, ECL (Amersham Biosciences). In ogni gel è stata valutata anche l'espressione di una proteina housekeeping con anticorpo primario anti-GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). I segnali di chemiluminescenza ottenuti dallo sviluppo delle membrane sono stati catturati con Kodak Gel Logic 2200 Digital Imaging System (Eastman Kodak, Rochester, NY) e l'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il software Kodak Molecular Imaging Software, versione 4.0.5.

#### **4.7.MISURAZIONI MORFOMETRICHE DELLE ARTERIE BASILARI**

Dopo fissazione, gli encefali sono stati lavati in PBS (3 lavaggi da 15 minuti ciascuno) e poi immersi in soluzioni crescenti di saccarosio disciolto in PBS (dal 10%, 15% e al 25%+10% di glicerolo) e conservati a 4°C. Un'ora prima del congelamento il materiale è stato messo in una miscela composta dal 50% di una soluzione 25% di saccarosio + 10% di glicerolo e dall'altro 50% di liquido d'inclusione per criostato (OCT, Bio-optica, Milano, Italia). Quindi, gli encefali sono stati immersi in OCT e congelati in isopentano preraffreddato in azoto liquido e conservati a -80° C fino al successivo taglio al criostato (Bio-optica). Sono state effettuate sezioni di 20 µm di spessore lungo tutto il tronco encefalico, scegliendo come sezioni per le analisi morfometriche le 3 in corrispondenza rispettivamente della biforcazione dell'arteria basilare, dell'origine dell'arteria cerebellare antero inferiore e poco dopo l'origine della basilare. È stata quindi effettuata la colorazione ematossilina-eosina delle sezioni di interesse secondo il seguente protocollo: 1) 15 minuti in Ematossilina (Bio-optica); 2) 10 minuti in acqua di fonte corrente; 3) passaggio in acqua distillata; 4) 5 minuti in Eosina (Bio-optica); 5) Successiva scala alcolica per 5 minuti in ogni alcool (50°, 70°, 80°, 96°, 100°, ed infine xilolo). Per l'osservazione al microscopio ottico i preparati sono stati montati con DPX (Sigma, St Louis, MO, USA). Le sezioni tissutali sono state osservate con un microscopio Nikon Eclipse TE300. I fotogrammi sono stati ottenuti con un sistema fotografico Zeiss. È stata quindi effettuata una valutazione dei diametri e delle aree delle arterie, e dello spessore della parete, per ogni sezione di interesse e per ogni campione cerebrale.

#### **4.8.DOSAGGIO TNF- $\alpha$ , IL-6 E IL-10 NEL PLASMA**

Il dosaggio dei livelli plasmatici di TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 è stato effettuato utilizzando i kit ELISA Endogen Rat (Pierce, Rockford, IL, USA), secondo la procedura indicata dal protocollo.

#### **4.9.DOSAGGIO NO PLASMATICO**

Il dosaggio avviene in 2 passaggi consecutivi. Nel primo step, mediante l'utilizzo dell'enzima nitrato reduttasi (Boehringer Mannheim diagnostics, Concord, CA) e dei cofattori NADPH (Boehringer Mannheim diagnostics, Concord, CA) e FADH (Sigma, St. Louis, MO), avviene la riduzione di nitrati (NO<sub>3</sub>) a nitriti (NO<sub>2</sub>). Successivamente, vengono dosati i nitriti con metodo colorimetrico. La concentrazione di nitriti dei campioni viene estrapolata dagli OD ottenuti misurando una curva standard di 250  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M. Brevemente, in una piastra da 96 pozzetti sono stati pipettati 50 microl di campione x pozzetto a cui sono stati aggiunti 50 microl di mix di reazione così costituita: 1) 10 microl di nitrato redattasi (2 U/ml); 2) 10  $\mu$ l di NADPH 1.72 mM; 3) 10  $\mu$ l di FAD 0.23 mM (FAD 1X); 4) 20  $\mu$ l di Tampone Fosfato pH 7.5. Dopo 30-60 minuti di incubazione al buio a TA, sono stati aggiunti 200 microl di reattivo di Griess preparato miscelando 1:1 la soluzione A (N-(1-NAPHTHYL) ETHYLENDIAMINE DIHYDROCHLORIDE 0.1% in acqua distillata) e la soluzione B (ACIDO SULFALINICO (SULFANILAMIDE) 1% in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%). La piastra è stata incubata per 10 minuti e poi letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm. La colorazione che si sviluppa è direttamente proporzionale alla concentrazione di nitriti presenti.



#### **4.10.ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei dati di espressione è stata effettuata mediante One Way Analysis of Variance (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

Per le analisi morfometriche è stato effettuato un test t di Student confrontando le misurazioni ottenute nel gruppo ESA rispetto al gruppo controllo.

Sono stati considerati significativi i valori di probabilità inferiori a 0.05.

## **5. RISULTATI**

### **5.1. OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA CHIRURGICA PER L'INDUZIONE DELL'ESA NEL RATTO**

In linea con i dati riportati in letteratura la mortalità gravante sul modello utilizzato di ESA, basato sulla singola iniezione di sangue autologo in cisterna magna, è risultata essere di circa il 14%, principalmente attribuibile all'anestesia ma in parte anche alla procedura di puntura della cisterna magna (Figura 10).

L'ottimizzazione della procedura di anestesia ha consentito il risveglio graduale del ratto dopo l'induzione di ESA, eliminando la necessità di mantenere l'animale in anestesia generale fino al momento del sacrificio.

La somministrazione di fentanyl ha infine determinato un ottimo controllo del dolore (nessun segno di sofferenza dell'animale al controllo ispettivo durante il periodo di osservazione).

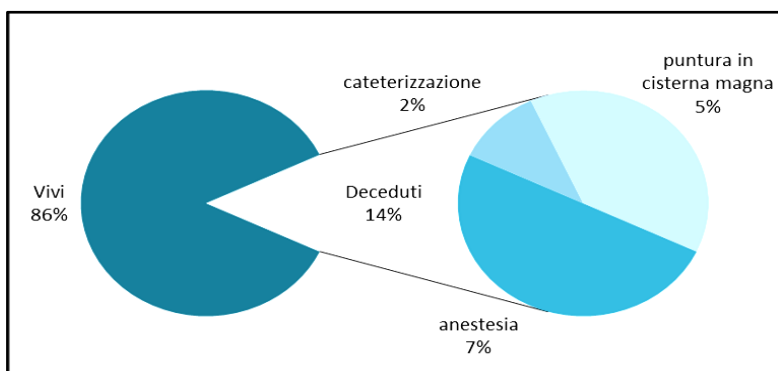
Pressione arteriosa, temperatura corporea e frequenza respiratoria sono risultate nella norma sia al momento della puntura in cisterna magna che al sacrificio (Tabella 2).

L'emogasanalisi ha evidenziato un normale equilibrio acido-base e nei livelli di elettroliti nel sangue tra animali sham e sottoposti ad induzione di ESA (Tabella 3).

L'esame autoptico ha confermato l'assenza di sangue nei ratti controllo e la presenza di sangue confinato in cisterna magna negli animali in cui è stata indotta l'emorragia subaracnoidea (Figura 11).

L'analisi dell'espressione nel fegato dei trascritti per LPS binding protein (LBP), C-reactive protein (CRP) e TNF- $\alpha$  ha escluso qualsiasi tipo di contaminazione dovuto alla procedura chirurgica e ha validato la sterilità della stessa (Figura 12).

Una volta ottimizzate l'anestesia e la procedura chirurgica, è stata effettuata un'analisi preliminare dell'espressione di geni flogistici a livello dell'arteria basilare per valutare se la procedura basata sulla singola iniezione di sangue autologo fosse idonea per ottenere un modello sperimentale di ESA che riproduca gli aspetti associati a questa patologia. Tale analisi ha indicato che vi è una rapida e marcata up-regolazione di TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1 e CXCL-1, geni coinvolti nella risposta infiammatoria, e di ET-1 e NOS2, coinvolti nella regolazione della vasocostrizione/vasodilatazione (Figura 13).



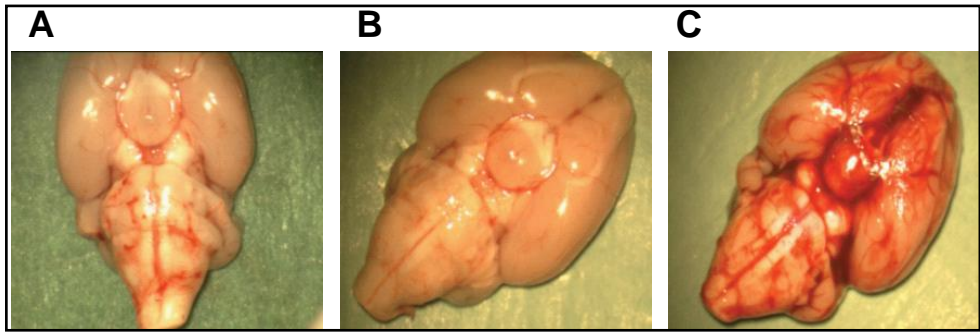
*Figura 10 Mortalità del modello sperimentale di ESA indotta mediante singola iniezione di sangue autologo in cisterna magna*

	Pressione arteriosa (mmHg)		Temperatura rettale (°C)		Frequenza respiratoria (atti/min)	
	Puntura / ESA	Sacrificio	Puntura / ESA	Sacrificio	Puntura / ESA	Sacrificio
<b>Basale</b>		103 ± 2		37 ± 0.1		85 ± 2
<b>Sham</b>	94 ± 6	82 ± 11	36.8 ± 0.1	36.5 ± 0.12	83 ± 11	87 ± 4
<b>ESA</b>	92 ± 4	88 ± 4	36.8 ± 0.1	36.7 ± 0.13	87 ± 3	89 ± 4

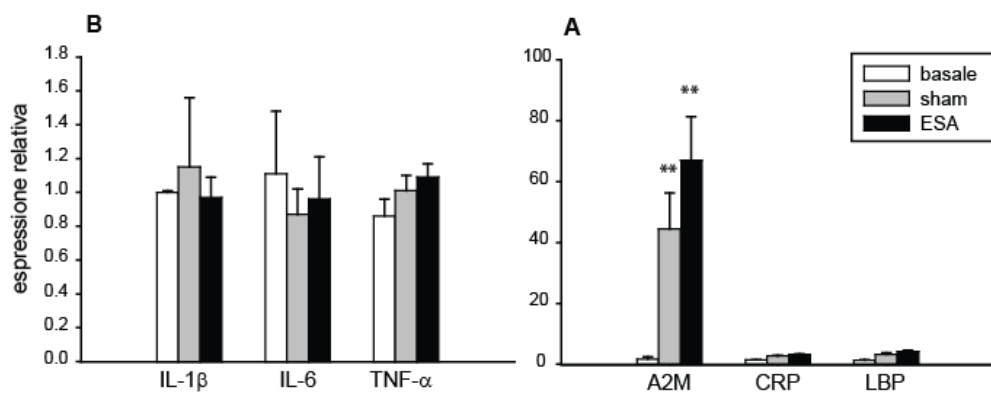
*Tabella 2 Pressione arteriosa, temperatura corporea e frequenza respiratoria. I valori sono espressi come media (N=16) ± errore standard*

	pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	pO <sub>2</sub> (mmHg)	SatO <sub>2</sub> (%)	Hb (g/dL)	K <sup>+</sup> (meq/L)	Na <sup>+</sup> (meq/L)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)
<b>Basale</b>	7.41± 0.01	40.00 ± 2.00	140 ± 5.00	97 ± 1.00	14.19 ± 1.25	4.00 ± 0.1	136 ± 0.5	27.0 ± 2.00
<b>Sham</b>	7.41± 0.01	45.33 ± 1.58	153 ± 4.66	98.3 ± 1.82	13.39 ± 0.27	3.98 ± 0.08	136.29 ± 0.6	29.53 ± 0.74
<b>ESA</b>	7.41± 0.01	45.73 ± 1.35	134.8 ± 7.57	99.78 ± 0.95	12.62 ± 0.22	4.01 ± 0.09	135.13 ± 0.35	28.78 ± 0.46

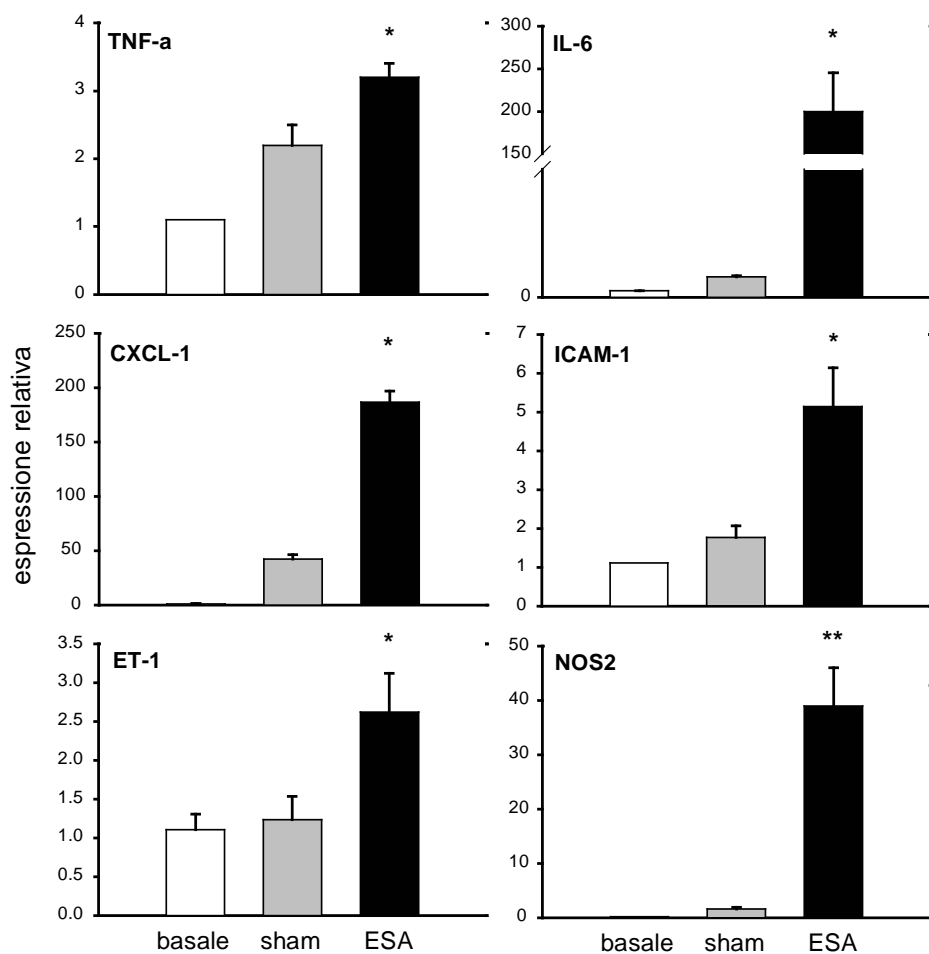
*Tabella 3 Livelli di elettroliti nel sangue periferico. I valori sono espressi come media (N=16) ± errore standard*



*Figura 11 Esame autoptico. Si apprezza la presenza di sangue a livello delle cisterne della base nel gruppo ESA (C); non si rivela presenza di sangue nei gruppi basale (a) e sham (B)*



*Figura 12 Analisi dell'espressione di citochine pro-infiammatorie (A) e geni coinvolti nella risposta di fase acuta a livello epatico (B). I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard (N=9; ). One-way ANOVA, Bonferroni test; p vs basale: \*\*p < 0.01*



*Figura 13 Espressione di geni pro-infiammatori. I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard (N=3 pools; ciascun pool è composto da 3 arterie). One-way ANOVA, Bonferroni test; p vs sham: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01*



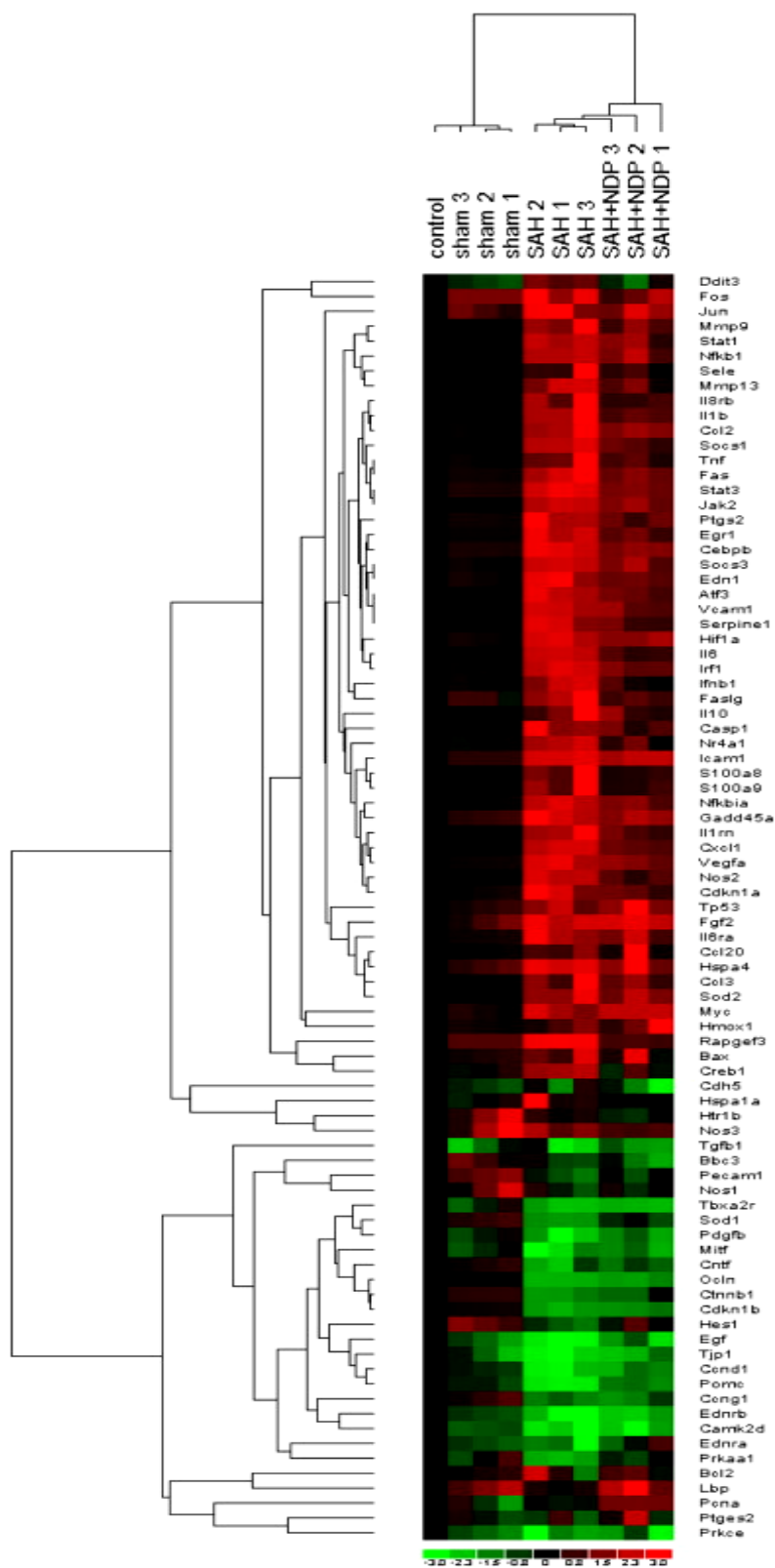
## **5.2. EFFETTI SUL FENOTIPO MOLECOLARE DELL'ARTERIA BASILARE DELL'ESA E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO CON MELANOCORTINE**

### **5.2.1. IL TRATTAMENTO CON NDP-MSH INIBISCE LE MODIFICAZIONI INDOTTE PRECOCEMENTE DALL'ESA NELL'ARTERIA BASILARE**

L'ESA induce precocemente una profonda alterazione del profilo di espressione genica dell'arteria basilare. L'analisi non supervisionata mediante clustering gerarchico agglomerativo, che raggruppa i campioni sulla base del profilo di espressione, ha suddiviso i campioni in esame in 2 gruppi: A) animali basali e sham; B) gruppo ESA + salina e ESA + NDP-MSH (Figura 14). Ciò indica che la presenza di sangue a livello della cisterna magna è associata ad una alterazione statisticamente significativa del profilo di trascrizione dell'arteria basilare. Se si prende in considerazione il ramo del cluster che raggruppa i campioni prelevati da animali con ESA, si può osservare come l'analisi discrimini i campioni non trattati dai trattati, indicando che il trattamento con NDP-MSH risulta associato ad un pattern di espressione specifico dell'arteria basilare.

Per identificare i geni differenzialmente espressi, è stata effettuata un'analisi two class unpaired con il software Significance analysis of Microarrays (SAM, versione 3.2), comparando gli animali con ESA vs gli sham e successivamente il gruppo ESA + salina vs ESA + NDP-MSH. Considerando soltanto geni con fold change > 2 e FDR=0 (q=0), sono stati identificati 58 geni differenzialmente espressi, 45 indotti e 13 repressi dall'ESA (Tabella 5). Fra i geni up-regolati vi sono molecole coinvolte nell'apoptosi, nel rimodellamento vascolare, nella risposta infiammatoria, nella risposta allo stress e nella regolazione del tono vascolare. I geni repressi comprendono trascritti implicati nel ciclo cellulare e componenti delle giunzioni intercellulari. Tra i geni la cui espressione viene influenzata dall'ESA, 34 trascritti vengono significativamente modulati dal trattamento con NDP-MSH (Tabella 5). In particolare, il peptide ha prevenuto l'induzione di vari geni coinvolti nella risposta infiammatoria, ha inibito l'induzione di geni pro-apototici e di geni che codificano per molecole vasoattive, tra cui ET-1. Ulteriormente, il trattamento con NDP-MSH ha mantenuto a livelli basali l'espressione di geni implicati nel rimodellamento della matrice extracellulare e ha invece indotto l'espressione di trascritti che codificano per proteine di giunzione cellula-cellula e cicline.

Le analisi in Western Blot hanno indicato che l'ESA induce nell'arteria basilare la fosforilazione di ERK1/2 e I $\kappa$ B $\alpha$ . Le proteine fosforilate Phospho-p38, Phospho-STAT1 e Phospho-STAT3 non hanno mostrato differenze rispetto allo sham a 4 h dall'induzione di ESA (dati non riportati). Il trattamento con NDP-MSH ha mantenuto a livello basali sia la fosforilazione di ERK1/2 che di I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 15).



*Figura 14 Analisi non supervisionata dei profili di espressione delle arterie basilari. L'espressione genica è stata valutata mediante TLDA. I dati sono stati analizzati mediante clustering gerarchico agglomerativo: metodo di linkage: average; distanza metrica: 1- coefficiente di correlazione di Pearson. Le colonne denotano i pool (3 arterie per ciascun pool); le righe riportano i singoli geni analizzati. In rosso sono riportati i geni up-regolati, in verde i geni down-regolati*

Gene Symbol	Gene Name	FC vs Sham		T-statistics (q-value)	
		Saline	NDP	Saline vs Sham	NDP vs Saline
Apoptosis					
Fas	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	3,33	2,17	0,000	0,000
Casp1	Caspase 1	2,70	1,84	0,000	ns
Faslg	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	2,03	1,32	0,000	0,000
Vascular Remodelling					
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	5,13	3,43	0,000	ns
Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	3,32	1,93	0,000	0,015
Myc	Myelocytomatosis oncogene	3,10	3,50	0,000	ns
Ccng1	Cyclin G1	0,58	0,60	0,000	ns
Egf	Epidermal growth factor	0,47	0,86	0,000	0,036
Ccnd1	Cyclin D1	0,35	0,65	0,000	0,036
Cdkn1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	0,30	0,40	0,000	ns
Cell junctions					
Ocln	Occludin	0,06	0,19	0,000	0,013
Tjp1	Tight junction protein 1	0,55	0,81	0,000	ns
Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	0,41	0,61	0,000	ns
Extracellular proteases					
Mmp13	Matrix metallopeptidase 13	82,13	31,66	0,000	0,024
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	47,68	20,31	0,000	0,000
Mmp9	Matrix metallopeptidase 9	13,59	7,78	0,000	0,024
Stress-induced genes					
Atf3	Activating transcription factor 3	18,40	9,74	0,000	0,000
Irf1	Interferon regulatory factor 1	7,10	4,06	0,000	0,000
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	5,23	3,81	0,000	ns
Egr1	Early growth response 1	4,99	2,82	0,000	0,015
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily4, groupA, member1	3,44	1,71	0,000	0,015
Gadd45a	Growth arrest DNA-damage-inducible, alpha	2,19	1,71	0,000	ns
Immune regulators					
Socs1	Suppressor of cytokine signaling 1	31,32	13,96	0,000	0,000
Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	13,23	8,01	0,000	ns

<b>Socs3</b>	Suppressor of cytokine signaling 3	11,98	7,53	0,000	0,024
<b>Il10</b>	Interleukin 10	9,79	5,88	0,000	ns
<b>Pomc</b>	Proopiomelanocortin	0,11	0,36	0,000	0,050
<b>Inflammatory response</b>					
<b>Nos2</b>	Nitric oxide synthase 2, inducible	468,46	180,17	0,000	0,000
<b>Il6</b>	Interleukin 6	333,90	110,97	0,000	0,000
<b>Cxcl1</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	33,78	16,49	0,000	0,000
<b>Il1rn</b>	Interleukin 1 receptor antagonist	31,61	14,27	0,000	0,000
<b>S100a9</b>	S100 calcium binding protein A9	29,87	9,51	0,000	0,000
<b>S100a8</b>	S100 calcium binding protein A8	25,32	8,18	0,000	0,000
<b>Il8rb</b>	Interleukin 8 receptor, beta	22,70	8,71	0,000	0,000
<b>Il1b</b>	Interleukin 1 beta	16,56	7,66	0,000	0,000
<b>Ccl2</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	15,54	11,51	0,000	ns
<b>Vcam1</b>	Vascular cell adhesion molecule 1	11,98	7,14	0,000	0,015
<b>Sele</b>	selectin E	11,24	5,39	0,000	0,038
<b>Ccl3</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	8,99	6,32	0,000	ns
<b>Tnf</b>	Tumor necrosis factor	7,30	3,43	0,000	0,024
<b>Ifnb1</b>	Interferon beta 1, fibroblast	7,10	2,09	0,000	0,000
<b>Nfkbia</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	6,40	4,10	0,000	0,015
<b>Ptgs2</b>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	6,09	3,05	0,000	0,000
<b>Il6ra</b>	Interleukin 6 receptor, alpha	3,88	2,75	0,000	ns
<b>Icam1</b>	Intercellular adhesion molecule 1	3,12	2,70	0,000	ns
<b>Pecam1</b>	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	0,31	0,51	0,000	ns
<b>Response to oxidative stress</b>					
<b>Sod2</b>	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	12,87	10,47	0,000	ns
<b>Hif1a</b>	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	2,56	2,08	0,000	ns
<b>Hmox1</b>	heme oxygenase (decycling) 1	2,50	4,03	0,000	0,050
<b>Signal transduction</b>					
<b>Jak2</b>	Janus kinase 2	6,40	4,64	0,000	ns
<b>Stat3</b>	Signal transducer activator of transcription3	3,35	2,52	0,000	ns
<b>Stat1</b>	Signal transducer activator of transcription1	2,05	1,64	0,000	ns

<b>Prkaa1</b>	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	0,59	0,92	0,000	0,013
<b>Cntf</b>	Ciliary neurotrophic factor	0,45	0,61	0,000	ns
<b>Transcription</b>					
<b>Cebpb</b>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	4,34	2,77	0,000	0,000
<b>Hes1</b>	Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	0,59	0,82	0,000	ns
<b>Vascular tone regulation</b>					
<b>Edn1</b>	Endothelin 1	3,99	2,39	0,000	0,000
<b>Nos1</b>	Nitric oxide synthase 1, neuronal	0,47	0,59	0,000	ns

*Tabella 4 Geni la cui espressione viene modificata dall'ESA rispetto allo sham (q=0) ed effetto del trattamento con NDP-MSH. Analisi two class unpaired effettuata con il software SAM. Criterio di inclusione: fold change>2*

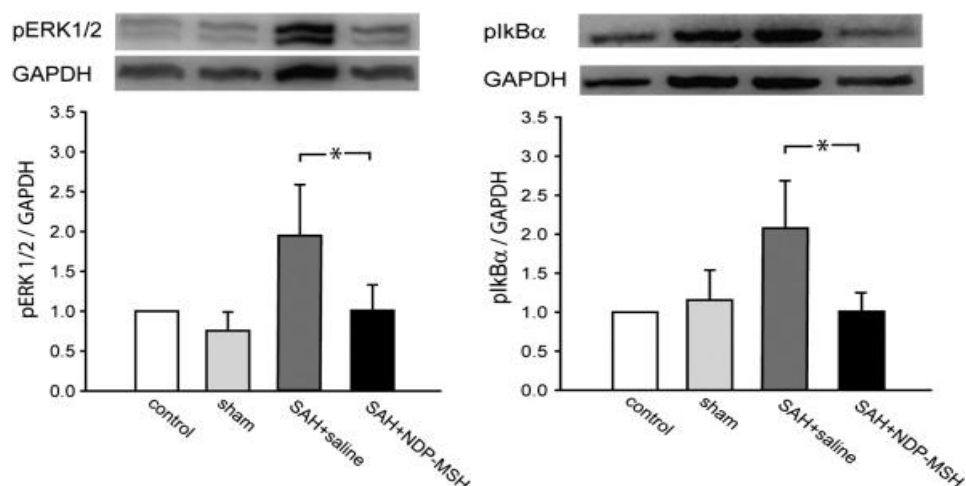
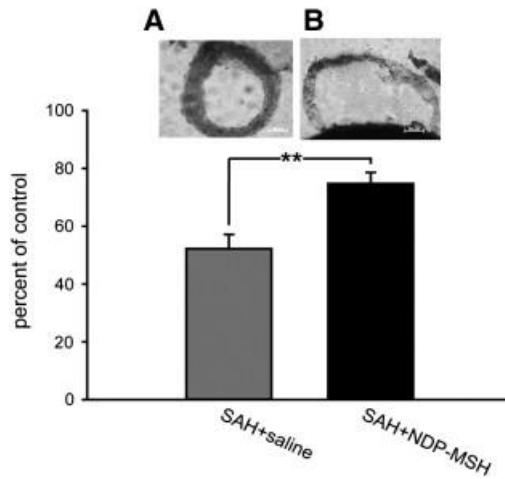


Figura 15 L'ESA induce la fosforilazione di ERK1/2 e  $I\kappa B\alpha$  nell'arteria basilare. L'analisi in Western Blot indica che i livelli di Phospho-ERK1/2 e di Phospho-  $I\kappa B\alpha$  sono significativamente inferiori nei campioni trattati con NDP-MSH. I dati sono espressi come media (N=9)  $\pm$  errore standard (si riporta un'immagine di un gel SDS-page esemplificativo). One-way ANOVA, Bonferroni test, \*  $p < 0.05$ .

### **5.2.2. IL TRATTAMENTO CON NDP-MSH RIDUCE IL VASOSPASMO DELL'ARTERIA BASILARE**

Le analisi morfometriche (area e diametro) delle arterie basilari prelevate dopo 5 giorni dall'iniezione di sangue hanno mostrato una sostanziale riduzione nei diametri dei ratti sottoposti ad ESA rispetto ai basali ( $296 \pm 13$  e  $156 \pm 37$  mm,  $p < 0.05$ ). Tale riduzione del diametro vasale è significativamente attenuata dal trattamento con NDP-MSH somministrato con una singola iniezione immediatamente dopo l'induzione dell'ESA ( $217 \pm 20$  mm,  $p < 0.01$  vs ESA) (Figura 16).





*Figura 16 Analisi morfometriche delle arterie basilari prelevate dopo 5 giorni dall'induzione dell'ESA. L'iniezione di sangue induce una vasocostrizione che viene significativamente inibita dal trattamento con NDP-MSH. I dati sono espressi come media (N=6)  $\pm$  errore standard. Test t di student, \*\*  $p < 0.00$ . Si riporta immagine esemplificativa. H&E, 40X.*

### **5.3. STUDIO PRELIMINARE DEGLI EFFETTI SISTEMICI E NEGLI ORGANI PERIFERICI DELL'ESA**

#### **5.3.1. A L'ESA NON SI ASSOCIA AD INCREMENTO DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE E NO NEL PLASMA**

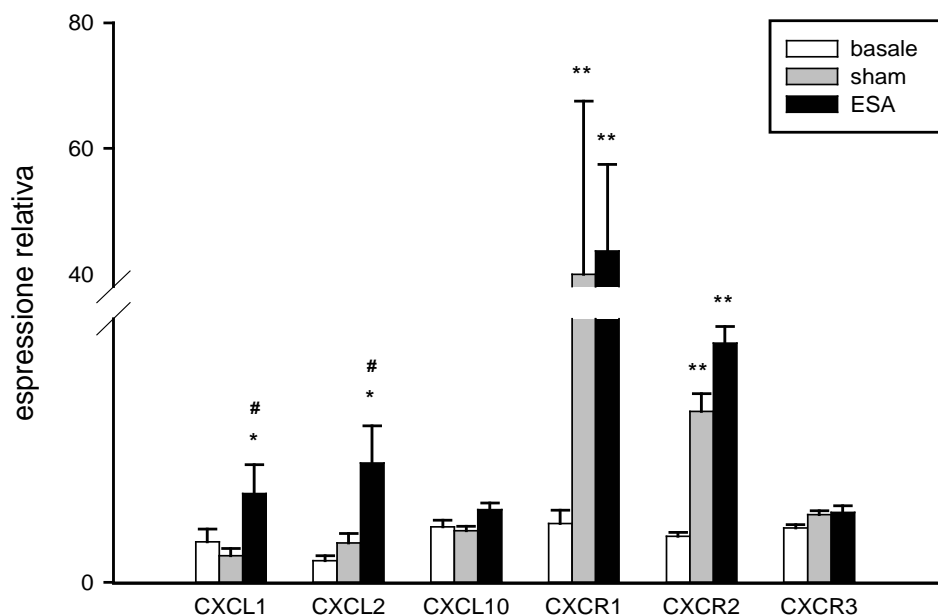
Non sono state riscontrate variazioni significative delle concentrazioni di TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO plasmatici, nè a 4 ore, nè a 5 giorni dall'ESA (dati non mostrati).

### **5.3.2. L'ESA NON INDUCE MODIFICAZIONI SIGNIFICATIVE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEL TRATTO INTESTINALE**

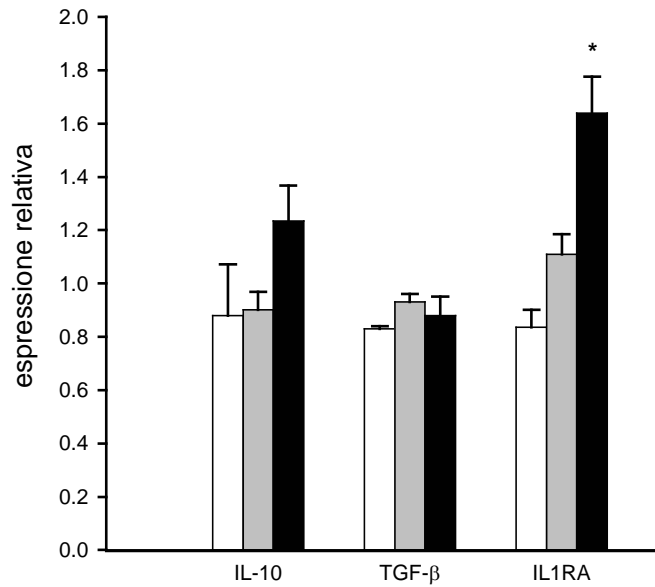
L'analisi in RT-PCR indica che a livello dell'intestino crasso non vi sono alterazioni del profilo di espressione dopo 4 ore dall'induzione dell'ESA. Sono stati valutati: molecole pro-infiammatorie (TNF, IL-1, IL-6, HMGB1, ICAM-1, LBP, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, RANTES, NOS2), geni codificanti per proteine di giunzione cellula-cellula e cellula-membrana basale (TJP1, OCLN, CLDN1, CLDN5, CDH1, ITGa, ITGb, MMP9, TIMP1), geni implicati nella risposta allo stress (HSPA4, HSPCA, HSPA1A, HMOX-1) (dati non mostrati).

### **5.3.3. IL DANNO CENTRALE E IL VERSAMENTO EMATICO INDUCONO ALTERAZIONI PRECOCI NELLA MILZA**

L'attivazione della risposta infiammatoria a livello del tessuto splenico è stata valutata analizzando l'espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$ ) e chemochine e loro recettori (MCP-1, CCR2, MIP-1a, CCR5, CCL20, RANTES, CCR6, CXCL-1, CXCL2, CXCL10, CXCR1, CXCR2, CXCR3). I dati ottenuti indicano che il danno centrale induce specificatamente l'espressione delle chemochine della famiglia CXC e dei loro recettori (Figura 17), mentre non influenza la trascrizione di citochine e chemochine CC (dati non mostrati). Le chemochine CXCL1 e CXCL2 sembrano essere indotte specificamente dal versamento ematico. Per quanto riguarda la valutazione di molecole anti-infiammatorie, l'analisi in RT-PCR indica che a 4 ore dal danno centrale vi è un'aumento di IL-1ra, ma non di TGF- $\beta$  e IL-10 (Figura 18).



*Figura 17 Valutazione dell'espressione di chemochine rappresentative della famiglia CXC e dei loro recettori. I valori sono espressi come media (N=9)  $\pm$  errore standard. One-way ANOVA, Bonferroni test; p vs basale: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; p vs sham: #p < 0.05*

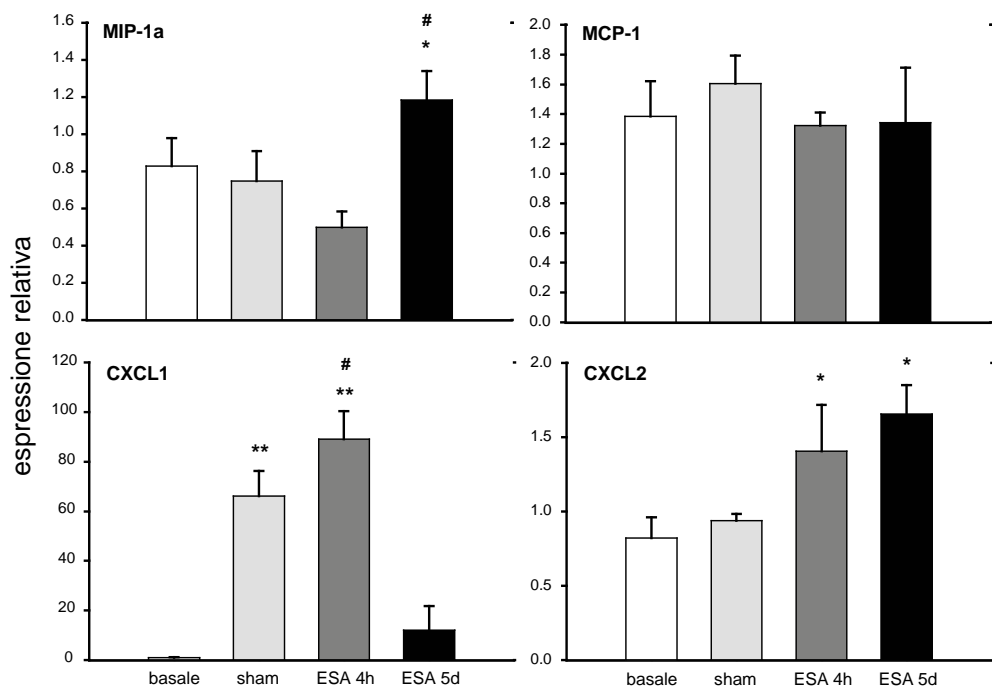


*Figura 18 Analisi dell'espressione di citochine con proprietà anti-infiammatorie. I valori sono espressi come media (N=9)  $\pm$  errore standard; One-way ANOVA, Bonferroni test; p vs basale: \*p < 0.05*

#### **5.3.4. IL DANNO CENTRALE È ASSOCIATO AD ALTERAZIONI PRECOCI E TARDIVE DELL'ESPRESSIONE GENICA EPATICA.**

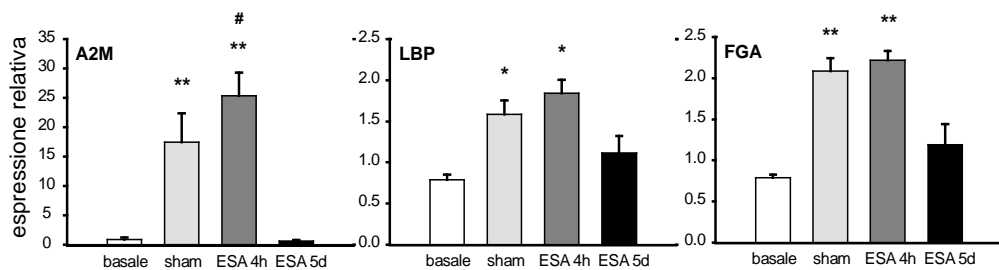
A livello epatico, è stata valutata l'espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$ , NOS2), nel reclutamento di immunociti (MCP-1, CCR2, MIP-1 $\alpha$ , CCR5, RANTES, CCR6, CXCL1, CXCL2, CXCR1, CXCR2), nella risposta allo stress (ATF3, EGR1, HSPA1 $\alpha$ , HSPB1, HMOX1, NQO1, GSTA2, SOD1, SOD2) e nella risposta di fase acuta (CRP, LBP, A2M, SCARB-1, FGA, MBL2, S100a8, S100a9, IL1RA) a 4 ore e 5 giorni dall'induzione dell'ESA. I dati mostrano che, in seguito alla procedura, non vi sono segni di una risposta infiammatoria a livello epatico, in quanto l'espressione delle citochine e delle chemochine non è alterata nei gruppi sham ed ESA rispetto al basale (dati non mostrati). Il danno centrale induce a 4 ore la trascrizione della chemochina della famiglia CC MIP-1 $\alpha$ , ma non di MCP-1 (Figura 19). Le chemochine della famiglia CXC, CXCL1 e CXCL2 vengono up-regolate già a partire da 4 ore; l'ESA induce un ulteriore aumento della produzione di CXCL1 rispetto allo sham (Figura 19).

La risposta di fase acuta appare indotta già dopo 4 ore dal trauma a livello centrale (Figura 20). Analogamente, il tessuto epatico presenta un'up-regolazione di diversi geni coinvolti nella risposta allo stress, sia a 4 ore che a 5 giorni dalla procedura chirurgica (Figura 21). ATF3, HSPB1, HSPA1A sembrano essere specificatamente indotti dal versamento ematico nello spazio subaracnoideo. Trascritti di risposta specifica allo stress ossidativo, quali SOD1, SOD2, GSTA2 e NQO1 non sono invece alterati (dati non mostrati).



*Figura 19 Espressione di geni rappresentativi della famiglia CC (MIP-1 $\alpha$  e MCP-1) e CXC (CXCL1 e CXCL2) delle chemochine. I valori sono espressi come media (N=9)  $\pm$  errore standard; One-way ANOVA, Bonferroni test; p vs basale: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; p vs sham: #p < 0.05*





*Figura 20 Espressione di geni rappresentativi delle proteine di fase acuta. I valori sono espressi come media (N=9)  $\pm$  errore standard. One-way ANOVA, Bonferroni test;  $p$  vs basale: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ;  $p$  vs sham: # $p < 0.05$*

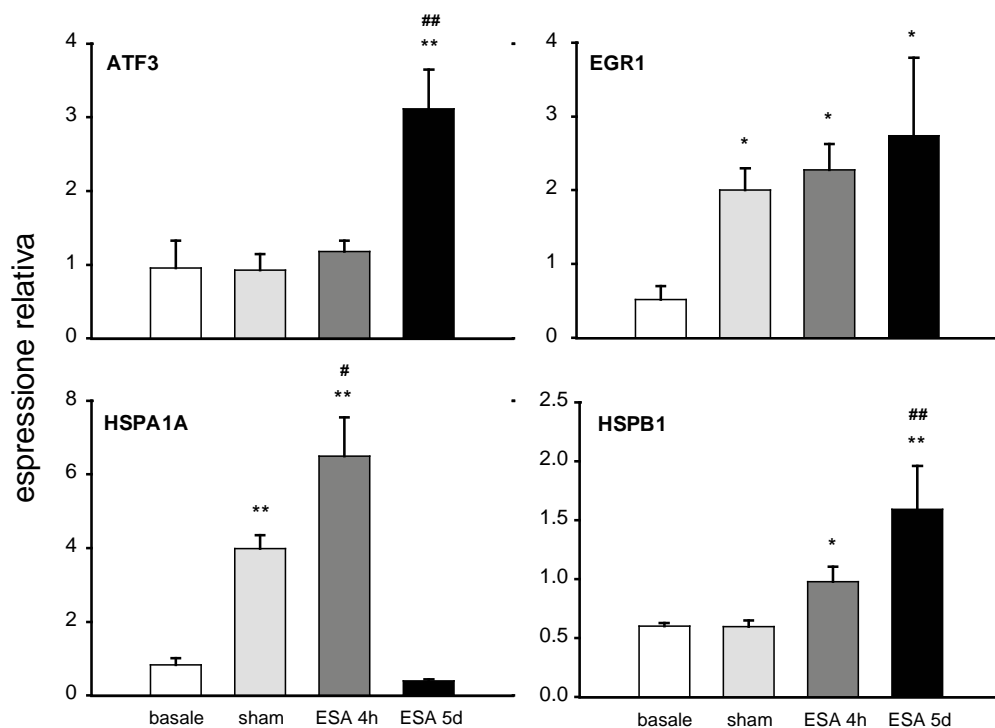


Figura 21 Valutazione dell'espressione di geni coinvolti nella risposta allo stress. I valori sono espressi come media (N=9)  $\pm$  errore standard. One-way ANOVA, Bonferroni test;  $p$  vs basale:  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ;  $p$  vs sham:  $\#p < 0.05$ ;  $\##p < 0.01$

## 6.DISCUSSIONE

La prima parte di questa ricerca si è focalizzata sulla ottimizzazione di un modello sperimentale di ESA nel ratto allo scopo di minimizzare gli effetti delle procedure invasive (anestesia, cateterizzazione, intervento chirurgico). Poichè la cascata di eventi nelle ore immediatamente successive allo spargimento ematico sembra essere causa del danno tissutale precoce e a lungo termine, si è scelto di mettere a punto un modello a singola iniezione di sangue nella cisterna magna. Il modello a doppia iniezione non è stato ritenuto idoneo per lo studio delle modificazioni precoci, in quanto fotografa una situazione già tardiva. A conferma della validità della procedura basata sulla singola iniezione, l'analisi di trascritti rappresentativi dei fenomeni indotti dall'ESA ha riportato un'intensa risposta infiammatoria a livello dell'arteria basilare.

L'analisi molecolare dell'arteria basilare ha permesso di fornire indicazioni sulla precocità e intensità della risposta infiammatoria indotta dopo ESA. Infatti, il versamento ematico induce profonde modificazioni nell'espressione di molecole pro-infiammatorie, tra cui citochine, chemochine, molecole d'adesione e gli enzimi COX-2 e iNOS. Inoltre, è stata riscontrata l'induzione dell'espressione di molecole implicate nell'omeostasi e funzionalità vascolari. Fra queste vi è ET-1, un potente vasocostrittore prodotto da leucociti e cellule endoteliali, considerato in letteratura come un indice tardivo degli eventi correlati al vasospasmo. Il presente studio fornisce l'evidenza sperimentale dell'attivazione di ET-1 nell'arteria basilare già nelle prime fasi dopo emorragia. Riguardo ai pathway di segnalazione cellulare attivati nelle arterie basilari dall'ESA, è stata riscontrata la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  e di ERK1/2. L'attivazione di NF- $\kappa$ B a livello della parete arteriosa, che avviene in seguito a fosforilazione e conseguente degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$ , sembra essere, pertanto, un evento indotto precocemente dall'ESA. [15] [14]. I dati di espressione genica ottenuti correlano perfettamente con la valutazione del calibro dell'arteria effettuato a 5 giorni, che mostra una riduzione del 50% del diametro nei campioni derivati da animali con ESA rispetto al basale.

La fase successiva della ricerca si occuperà di identificare e caratterizzare le ripercussioni negli organi periferici dell'ESA. Le complicanze infiammatorie locali associate all'ESA non sono ancora state descritte in modo sistematico in un modello sperimentale adeguato. Chiarire e caratterizzare le lesioni indotte in questa patologia può contribuire ad ottimizzare l'approccio terapeutico.

Nello studio pilota delle ripercussioni periferiche, si è scelto di analizzare l'espressione di trascritti specifici in fegato, milza e intestino crasso. Dagli studi condotti in modelli sperimentali di insulto cerebrale, il tratto gastrointestinale risulta essere l'organo più sensibile e responsivo alle catecolamine prodotte in seguito al danno. La milza è stata presa in considerazione in quanto organo linfoide secondario con un ruolo chiave nello sviluppo della CIDS. Infine, il fegato è stato valutato per la sua capacità di rilasciare in circolo chemochine e citochine capaci di indurre la risposta di fase acuta e una risposta infiammatoria sistemica. I risultati preliminari ottenuti forniscono indicazioni circa la capacità dell'evento emorragico di attivare una risposta periferica e incoraggiano il proseguimento della ricerca allo scopo di caratterizzare in maniera più approfondita tale fenomeno.

Nella milza è stato rivelato un aumento dell'espressione di diversi componenti della famiglia delle chemochine CXC e dei loro recettori. In particolare, CXCL1 e CXCL2 vengono indotte specificamente dall'ESA. Studi recenti hanno indicato che in risposta a danno cerebrale e cardiaco si verifica la mobilitazione di monociti dalla milza al circolo [88, 89]. La milza sembra essere, pertanto, la "riserva" di monociti indifferenziati che possono essere reclutati rapidamente per attivare una risposta flogistica in qualsiasi distretto corporeo [89]. L'induzione dell'espressione delle chemochine CXC e dei loro recettori potrebbe contribuire all'attivazione della mobilitazione monocitaria [90]. A livello splenico è stata valutata anche la produzione di specifici mediatori anti-infiammatori che, una volta riversati in circolo, contribuiscono all'induzione della CIDS [32]. A 4 ore dall'ESA, si riscontra un aumento dell'espressione di IL1RA, mentre non vi sono variazioni nell'espressione di IL-10 e TGF- $\beta$ .

A livello epatico, è stata riscontrata, nel gruppo sham, l'induzione precoce di CXCL1 e CXCL2. La produzione di CXCL1 viene indotta ulteriormente dalla presenza di sangue in cisterna magna. Il rilascio di chemochine dal fegato sembra essere un passaggio chiave per l'attivazione della risposta di fase acuta, in quanto amplifica la risposta infiammatoria tessutale e sistemica e modula la leucocitosi. Diversi studi in modelli di danno centrale ad origine infiammatoria e traumatica hanno riportato l'importanza delle chemochine CXC epatiche nell'induzione della risposta infiammatoria periferica [49-51]. In particolare, CXCL1 è in grado di indurre il reclutamento di neutrofili a livello epatico e, se riversata in circolo, agisce come una proteina di fase acuta [50]. Un'altra osservazione importante, riguarda l'espressione della chemochina della famiglia CC MIP-1 $\alpha$ , che viene indotta a 5 giorni dall'ESA. Tale molecola è implicata nella mobilitazione di monociti dal circolo e nell'amplificazione della risposta infiammatoria sistemica in seguito a danno centrale [51]. I dati indicano che vi è un'induzione precoce della sintesi delle proteine epatiche di fase acuta. Tale induzione sembra essere associata al trauma centrale, in quanto non si osserva differenza tra il gruppo sham e il gruppo ESA. Soltanto A2M sembra essere specificatamente indotta dalla presenza di sangue a livello subaracnoideo. L'attivazione della risposta di fase acuta è cruciale per l'inizio della risposta infiammatoria sistemica ed è stata riportata in diversi studi condotti in modelli sperimentali di danno cerebrale [48]. Infine, si rivela l'induzione dei trascritti per le proteine heat shock HSPA1A e HSPB1 e dei geni di risposta allo stress ATF3 ed EGR1. Geni coinvolti nello stress ossidativo SOD1, SOD2, GSTA2 e NQO1 non vengono invece indotti.

Nella fase successiva della ricerca, è stata valutata l'efficacia del trattamento con la melanocortina sintetica NDP-MSH nel contrastare gli effetti deleteri dell'ESA. I dati ottenuti indicano che il trattamento sistemico con NDP-MSH ha prevenuto molte delle alterazioni indotte dall'ESA nell'arteria basilare. Inoltre, la somministrazione del peptide al momento del danno ha ridotto significativamente la vasocostrizione.

In linea con la ben caratterizzata azione anti-infiammatoria delle melanocortine, NDP-MSH ha modulato, nell'arteria basilare, la produzione di citochine, chemochine, molecole d'adesione, della NOS2 e di COX-2. Gli effetti protettivi del trattamento non sono limitati alla modulazione della risposta infiammatoria, ma influenzano altri eventi alla base della patogenesi del vasospasmo. Infatti, la somministrazione di NDP-MSH ha modulato anche l'espressione di molecole

vasoattive e di geni implicati nel controllo dell'omeostasi vascolare. Fra questi, appare promettente la marcata inibizione dell'espressione di ET-1. Tale vasocostrittore endogeno è considerato uno dei principali fattori patogenetici del vasospasmo e la modulazione della sua espressione appare fondamentale per prevenire lo sviluppo di questa grave complicanza [91]. Un altro effetto rilevante del trattamento con NDP-MSH è l'induzione di HMOX, l'enzima che catalizza la rottura del gruppo eme degli eritrociti. E' stato ipotizzato che l'espressione di HMOX1 in seguito ad ESA costituisca un meccanismo protettivo endogeno per aumentare la clearance dell'emoglobina presente nello spazio subaracnoideo. Uno studio sperimentale, in cui l'iniezione di molecole antisense in grado di bloccare l'attività enzimatica di HMOX1 hanno aggravato il vasospasmo, ha fornito le evidenze sperimentali in supporto di questa ipotesi [92]. Infine, il trattamento con NDP-MSH ha ridotto l'espressione di trascritti codificanti per proteine coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare e nell'angiogenesi, eventi che contribuiscono alla vasocostrizione delle arterie della base cranica in seguito ad ESA [10].

L'effetto protettivo di NDP-MSH sembra essere esercitato attraverso la modulazione di diverse vie di segnalazione. Infatti, il trattamento con NDP-MSH ha prevenuto la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  indotta dall'ESA e, quindi, l'attivazione di NF- $\kappa$ B a livello della parete arteriosa. NDP-MSH ha inibito anche la fosforilazione di ERK1/2, la cui attivazione è stata associata ad aumentata produzione di mediatori pro-infiammatori e metalloproteasi in modelli di ESA [93].

Le melanocortine sono peptidi endogeni, prodotti nel SNC e dalle cellule circolanti in seguito a stress, patogeni e traumi, in grado di controllare molteplici funzioni dell'organismo e di esercitare un'azione anti-infiammatoria e protettiva [59]. La somministrazione di peptidi sintetici può sfruttare i circuiti endogeni immunomodulanti protettivi.

Il presente studio dimostra che il trattamento con NDP-MSH ha modulato l'espressione di molecole coinvolte in fenomeni che contribuiscono alla genesi del vasospasmo e ha inibito la vasocostrizione indotta dall'ESA. Poichè il vasospasmo dell'arteria basilare contribuisce significativamente ad aggravare la prognosi dei pazienti [94], il trattamento con melanocortine può costituire una strategia terapeutica innovativa di questa condizione. Il razionale per l'utilizzo dei peptidi melanocortinici per il trattamento delle complicanze degli organi periferici è rappresentato dalla possibilità di attivare i circuiti immunomodulanti endogeni. Inoltre, studi clinici indicano che in pazienti con danno cerebrale acuto ridotti livelli plasmatici di  $\alpha$ -MSH sono associati ad una maggiore produzione di mediatori pro-infiammatori e ad una prognosi sfavorevole [78].

Diversi autori hanno proposto una terapia immunomodulante selettiva come valida opportunità terapeutica per il trattamento degli effetti periferici del danno al SNC [95]. E' possibile che l'attivazione specifica del ramo parasimpatico del SNA riduca gli effetti deleteri dell'iperattività del SNS, critica per l'induzione dell'immunodepressione e dell'infiammazione a livello dei tessuti periferici [44]. In un modello di ischemia cerebrale, l'attivazione selettiva della via anti-infiammatoria colinergica mediante trattamento con NDP-MSH, ha ridotto l'infiammazione epatica indotta dall'insulto centrale [76, 77, 82]. I peptidi melanocortinici si sono dimostrati in grado di modulare la soppressione dell'attività NK indotta da iniezioni intracerebroventricolari di IL-1 [87, 96].

Gli effetti benefici che le melanocortine potrebbero esercitare in pazienti con ESA riguardano anche il controllo della febbre, che rappresenta un fattore prognostico negativo [64, 97], la modulazione della SIRS [45] e il trattamento delle infezioni. Le proprietà immunosoppressive di corticosteroidi, FANS e ciclosporina limitano fortemente l'applicabilità di queste terapie nei pazienti con ESA. I peptidi melanocortinici non sopprimono la risposta infiammatoria e non riducono l'attività anti-microbica dei neutrofili, ma piuttosto, la inducono [98].

In conclusione, una terapia basata sull'uso delle melanocortine è potenzialmente in grado di ridurre l'infiammazione cerebrale e di esercitare effetti benefici negli organi periferici nei pazienti con ESA. L'utilizzo dei peptidi melanocortinici in terapia comporta svariati vantaggi: essendo molecole naturali vengono rapidamente metabolizzati dall'organismo per via renale o epato-biliare. I peptidi melanocortinici sono già utilizzati in trial clinici [99] e presentano una finestra terapeutica molto ampia [76].

## **7. CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE**

La complessità dei fenomeni che avvengono nelle fasi immediatamente successive all'ESA e il loro impatto sullo sviluppo delle complicanze, determinano la necessità di studi basati su modelli sperimentali ben caratterizzati e capaci di consentire analisi mirate su pathway chiave coinvolti in questi processi. Questa ricerca ha permesso la messa a punto di un modello di ESA, basato sulla singola iniezione di sangue in cisterna magna, in cui sono stati minimizzati gli effetti delle procedure tecniche (anestesia, intervento chirurgico), consentendo un'analisi più fine del profilo di espressione genica precocemente dopo ESA. I dati ottenuti forniscono indicazioni sulla precocità e intensità del processo infiammatorio conseguente al danno emorragico e aprono la strada allo studio delle interazioni tra i diversi pathway attivati dopo ESA e all'identificazione di nuovi target terapeutici precoci.

La fase successiva della ricerca prevede l'identificazione e la caratterizzazione delle ripercussioni sistemiche durante ESA. Una conoscenza più approfondita degli eventi molecolari potrebbe svelare alcuni processi chiave dello sviluppo delle complicanze periferiche e costituire la base per nuovi approcci terapeutici mirati, più efficaci e selettivi. Una volta chiarito il quadro molecolare e individuati i potenziali target terapeutici, verrà valutata l'efficacia di un trattamento basato sull'uso delle melanocortine per la terapia dell'ESA. I peptidi melanocortinici appaiono, infatti, candidati potenzialmente utili per il trattamento di questa condizione, in quanto in grado di modulare molecole implicate in diversi processi indotti dall'ESA.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, B., et al., *Health-related quality of life in patients with subarachnoid haemorrhage*. Cerebrovasc Dis, 2010. **30**(4): p. 423-31.
2. Suarez, J.I., R.W. Tarr, and W.R. Selman, *Aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. N Engl J Med, 2006. **354**(4): p. 387-96.
3. Burnett, M.G. and E.L. Zager, *Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review*. Neurosurg Focus, 2004. **16**(5): p. E1.
4. McGirt, M.J., et al., *Leukocytosis as an independent risk factor for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 2003. **98**(6): p. 1222-6.
5. Chaichana, K.L., et al., *Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. World Neurosurg, 2010. **73**(1): p. 22-41.
6. Recinos, P.F., et al., *Controlled release of lipopolysaccharide in the subarachnoid space of rabbits induces chronic vasospasm in the absence of blood*. Surg Neurol, 2006. **66**(5): p. 463-9; discussion 469.
7. Polin, R.S., et al., *Detection of soluble E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 1998. **89**(4): p. 559-67.
8. Gallia, G.L. and R.J. Tamargo, *Leukocyte-endothelial cell interactions in chronic vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2006. **28**(7): p. 750-8.
9. Aihara, Y., et al., *Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery after subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 2001. **32**(1): p. 212-7.
10. Vikman, P., et al., *Gene expression and molecular changes in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage in the rat*. J Neurosurg, 2006. **105**(3): p. 438-44.
11. Vikman, P., S. Ansar, and L. Edvinsson, *Transcriptional regulation of inflammatory and extracellular matrix-regulating genes in cerebral arteries following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation*. J Neurosurg, 2007. **107**(5): p. 1015-22.
12. Hendryk, S., B. Jarzab, and J. Josko, *Increase of the IL-1 beta and IL-6 levels in CSF in patients with vasospasm following aneurysmal SAH*. Neuro Endocrinol Lett, 2004. **25**(1-2): p. 141-7.
13. Manaenko, A., et al., *Effect of gap junction inhibition on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in mice*. Neurol Res, 2009. **31**(2): p. 173-8.
14. Zhou, M.L., et al., *Potential contribution of nuclear factor-kappaB to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(9): p. 1583-92.
15. Wan, F. and M.J. Lenardo, *The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 24-33.
16. Ma, C.X., et al., *Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling detected in brain after early subarachnoid hemorrhage*. Chin Med J (Engl), 2009. **122**(13): p. 1575-81.



17. Ono, S., et al., *Decoy administration of NF-kappaB into the subarachnoid space for cerebral angiopathy*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(7): p. 1003-11.
18. Fassbender, K., et al., *Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes*. Stroke, 2000. **31**(12): p. 2971-5.
19. Suzuki, K., et al., *Endothelin-1 concentration increases in the cerebrospinal fluid in cerebral vasospasm caused by subarachnoid hemorrhage*. Surg Neurol, 2000. **53**(2): p. 131-5.
20. Zubkov, A.Y., et al., *Risk factors for the development of post-traumatic cerebral vasospasm*. Surg Neurol, 2000. **53**(2): p. 126-30.
21. Zuccarello, M., et al., *Endothelin B receptor antagonists attenuate subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm*. Stroke, 1998. **29**(9): p. 1924-9.
22. Vajkoczy, P., et al., *Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study*. J Neurosurg, 2005. **103**(1): p. 9-17.
23. Nishizawa, S. and I. Laher, *Signaling mechanisms in cerebral vasospasm*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(1): p. 24-34.
24. Sehba, F.A. and J.B. Bederson, *Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2006. **28**(4): p. 381-98.
25. Pluta, R.M., *Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment*. Pharmacol Ther, 2005. **105**(1): p. 23-56.
26. Berra, L.V., et al., *The role of constitutive and inducible nitric oxide synthase in the human brain after subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg Sci, 2007. **51**(1): p. 1-9.
27. Macmillan, C.S., I.S. Grant, and P.J. Andrews, *Pulmonary and cardiac sequelae of subarachnoid haemorrhage: time for active management?* Intensive Care Med, 2002. **28**(8): p. 1012-23.
28. Wartenberg, K.E. and S.A. Mayer, *Medical complications after subarachnoid hemorrhage: new strategies for prevention and management*. Curr Opin Crit Care, 2006. **12**(2): p. 78-84.
29. Stocchetti, N., et al., *Impact of pyrexia on neurochemistry and cerebral oxygenation after acute brain injury*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(8): p. 1135-9.
30. Sarrafzadeh, A., et al., *Immunodepression after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 2011. **42**(1): p. 53-8.
31. Boysen, G. and H. Christensen, *Stroke severity determines body temperature in acute stroke*. Stroke, 2001. **32**(2): p. 413-7.
32. Meisel, C., et al., *Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(10): p. 775-86.
33. Kemp, C.D., et al., *How we die: the impact of nonneurologic organ dysfunction after severe traumatic brain injury*. Am Surg, 2008. **74**(9): p. 866-72.
34. Hayakata, T., et al., *Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury*. Shock, 2004. **22**(2): p. 102-7.
35. Pavlov, V.A., et al., *The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation*. Mol Med, 2003. **9**(5-8): p. 125-34.

36. Borovikova, L.V., et al., *Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 458-62.
37. Sternberg, E.M., *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 318-28.
38. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 853-9.
39. Chamorro, A., X. Urra, and A.M. Planas, *Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression*. Stroke, 2007. **38**(3): p. 1097-103.
40. Woiciechowsky, C., et al., *Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 808-13.
41. Dirnagl, U., et al., *Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 770-3.
42. Wong, C.H., et al., *Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke*. Science, 2011. **334**(6052): p. 101-5.
43. Prass, K., et al., *Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 725-36.
44. Kox, M., et al., *Increased vagal tone accounts for the observed immune paralysis in patients with traumatic brain injury*. Neurology, 2008. **70**(6): p. 480-5.
45. Stevens, R.D. and P.A. Nyquist, *The systemic implications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurol Sci, 2007. **261**(1-2): p. 143-56.
46. Hernandez, G., et al., *Splanchnic ischemia and gut permeability after acute brain injury secondary to intracranial hemorrhage*. Neurocrit Care, 2007. **7**(1): p. 40-4.
47. Yoshimoto, Y., Y. Tanaka, and K. Hoya, *Acute systemic inflammatory response syndrome in subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 2001. **32**(9): p. 1989-93.
48. Catania, A., et al., *Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(7): p. 877-84.
49. Campbell, S.J., et al., *Overexpression of IL-1beta by adenoviral-mediated gene transfer in the rat brain causes a prolonged hepatic chemokine response, axonal injury and the suppression of spontaneous behaviour*. Neurobiol Dis, 2007. **27**(2): p. 151-63.
50. Campbell, S.J., et al., *CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury*. FASEB J, 2003. **17**(9): p. 1168-70.
51. Campbell, S.J., et al., *Central nervous system injury triggers hepatic CC and CXC chemokine expression that is associated with leukocyte mobilization and recruitment to both the central nervous system and the liver*. Am J Pathol, 2005. **166**(5): p. 1487-97.
52. Wilcockson, D.C., et al., *The systemic and local acute phase response following acute brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(3): p. 318-26.
53. Hang, C.H., et al., *Up-regulation of intestinal nuclear factor kappa B and intercellular adhesion molecule-1 following traumatic brain injury in rats*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(8): p. 1149-54.

54. Hang, C.H., et al., *Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(12): p. 2776-81.
55. Kalsotra, A., et al., *Brain trauma leads to enhanced lung inflammation and injury: evidence for role of P4504Fs in resolution*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(5): p. 963-74.
56. Ozisik, K., et al., *Ultrastructural changes of rat cardiac myocytes in a time-dependent manner after traumatic brain injury*. Am J Transplant, 2004. **4**(6): p. 900-4.
57. Flierl, M.A., et al., *Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4414.
58. Flierl, M.A., et al., *Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 721-5.
59. Catania, A., *The melanocortin system in leukocyte biology*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(2): p. 383-92.
60. Mioni, C., et al., *Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats*. Crit Care Med, 2005. **33**(11): p. 2621-8.
61. Muceniece, R. and M. Dambrova, *Melanocortins in brain inflammation: the role of melanocortin receptor subtypes*. Adv Exp Med Biol, 2010. **681**: p. 61-70.
62. Catania, A., et al., *Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(1): p. 1-29.
63. Catania, A. and J.M. Lipton, *alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions*. Endocr Rev, 1993. **14**(5): p. 564-76.
64. Gatti, S., et al., *Protective effects of melanocortins in systemic host reactions*. Adv Exp Med Biol, 2010. **681**: p. 117-25.
65. Bitto, A., et al., *Melanocortins protect against multiple organ dysfunction syndrome in mice*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(4): p. 917-28.
66. Colombo, G., et al., *Production and effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone during acute lung injury*. Shock, 2007. **27**(3): p. 326-33.
67. Colombo, G., et al., *Gene expression profiling reveals multiple protective influences of the peptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in experimental heart transplantation*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3391-401.
68. Rajora, N., et al., *alpha-MSH modulates experimental inflammatory bowel disease*. Peptides, 1997. **18**(3): p. 381-5.
69. Lonati, C., et al., *Molecular changes induced in rat liver by hemorrhage and effects of melanocortin treatment*. Anesthesiology, 2012. **116**(3): p. 692-700.
70. Minutoli, L., et al., *Melanocortin 4 receptor stimulation decreases pancreatitis severity in rats by activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway*. Crit Care Med, 2011. **39**(5): p. 1089-96.
71. Giuliani, D., et al., *Selective melanocortin MC4 receptor agonists reverse haemorrhagic shock and prevent multiple organ damage*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(5): p. 595-603.
72. Catania, A., *Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity*. Trends Neurosci, 2008. **31**(7): p. 353-60.

73. Giuliani, D., et al., *Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melanocortins*. Eur J Pharmacol, 2007. **570**(1-3): p. 57-65.
74. Muceniece, R., et al., *The MC3 receptor binding affinity of melanocortins correlates with the nitric oxide production inhibition in mice brain inflammation model*. Peptides, 2006. **27**(6): p. 1443-50.
75. Huang, Q. and J.B. Tatro, *Alpha-melanocyte stimulating hormone suppresses intracerebral tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta gene expression following transient cerebral ischemia in mice*. Neurosci Lett, 2002. **334**(3): p. 186-90.
76. Giuliani, D., et al., *Broad therapeutic treatment window of [Nle(4), D-Phe(7)]alpha-melanocyte-stimulating hormone for long-lasting protection against ischemic stroke, in Mongolian gerbils*. Eur J Pharmacol, 2006. **538**(1-3): p. 48-56.
77. Giuliani, D., et al., *Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1126-35.
78. Magnoni, S., et al., *Alpha-melanocyte-stimulating hormone is decreased in plasma of patients with acute brain injury*. J Neurotrauma, 2003. **20**(3): p. 251-60.
79. Delgado Hernandez, R., et al., *Inhibition of systemic inflammation by central action of the neuropeptide alpha-melanocyte- stimulating hormone*. Neuroimmunomodulation, 1999. **6**(3): p. 187-92.
80. Ichiyama, T., et al., *Systemically administered alpha-melanocyte-stimulating peptides inhibit NF-kappaB activation in experimental brain inflammation*. Brain Res, 1999. **836**(1-2): p. 31-7.
81. Ichiyama, T., et al., *Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone*. J Neuroimmunol, 1999. **99**(2): p. 211-7.
82. Ottani, A., et al., *Vagus nerve mediates the protective effects of melanocortins against cerebral and systemic damage after ischemic stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(3): p. 512-23.
83. Guarini, S., et al., *Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock in anesthetized rats through the rapid activation of a vagal anti-inflammatory pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(2): p. 357-65.
84. Lipton, J.M., et al., *Antiinflammatory effects of the neuropeptide alpha-MSH in acute, chronic, and systemic inflammation*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **741**: p. 137-48.
85. Lipton, J.M., et al., *Central administration of the peptide alpha-MSH inhibits inflammation in the skin*. Peptides, 1991. **12**(4): p. 795-8.
86. Sundar, S.K., et al., *Intracerebroventricular infusion of interleukin 1 rapidly decreases peripheral cellular immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6398-402.
87. Cragnolini, A.B., et al., *alpha-MSH and gamma-MSH inhibit IL-1beta induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through central melanocortin receptors*. Regul Pept, 2004. **122**(3): p. 185-90.
88. Bao, Y., et al., *A role for spleen monocytes in post-ischemic brain inflammation and injury*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 92.

89. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
90. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
91. Kozniewska, E., et al., *Mechanisms of vascular dysfunction after subarachnoid hemorrhage*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 11**: p. 145-60.
92. Suzuki, H., et al., *Heme oxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 59-66.
93. Maddahi, A., et al., *Blockade of the MEK/ERK pathway with a raf inhibitor prevents activation of pro-inflammatory mediators in cerebral arteries and reduction in cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage in a rat model*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(1): p. 144-54.
94. Macdonald, R.L., R.M. Pluta, and J.H. Zhang, *Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution*. Nat Clin Pract Neurol, 2007. **3**(5): p. 256-63.
95. Meisel, C. and A. Meisel, *Suppressing immunosuppression after stroke*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2134-6.
96. Weiss, J.M., et al., *Effects of interleukin-1 infused into brain are antagonized by alpha-MSH in a dose-dependent manner*. Eur J Pharmacol, 1991. **192**(1): p. 177-9.
97. Fernandez, A., et al., *Fever after subarachnoid hemorrhage: risk factors and impact on outcome*. Neurology, 2007. **68**(13): p. 1013-9.
98. Catania, A., et al., *The melanocortin system in control of inflammation*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 1840-53.
99. Hadley, M.E. and R.T. Dorr, *Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization*. Peptides, 2006. **27**(4): p. 921-30.